

# Arbeiten auf dem Gebiete der chemischen Physiologie

Begonnen von

weil. Dr. **Franz Tangl**

Fortgesetzt von

weil. Dr. **Paul Hári**

Neunzehntes Heft

(Neue Folge. Vierzehntes Heft)

*In hoher Verehrung überreicht*

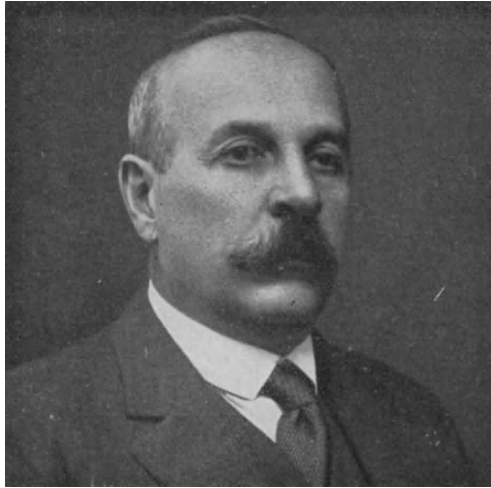
*von*

*Z. Aszódi*

---

*Budapest VIII, Eszterházy-Gasse 9.*

*Dem Andenken  
Paul Hári's  
gewidmet*



*Paul Kari*

# Arbeiten auf dem Gebiete der chemischen Physiologie

Begonnen von

weil. Dr. **Franz Tangl**

Fortgesetzt von

weil. Dr. **Paul Hári**

Neunzehntes Heft

(Neue Folge. Vierzehntes Heft)

ISBN 978-3-662-39390-1

ISBN 978-3-662-40446-1 (eBook)

DOI 10.1007/978-3-662-40446-1

Softcover reprint of the hardcover 1st edition 1934

# Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Neumann, Georg. Über die Kalibrierung der Orientierungsskala von Spektralapparaten. Biochem. Zeitschr. <b>248</b> , 208, 1932 . . . . .	1
Hári, Paul. Ein Kalorimeter für größere Tiere. Biochem. Zeitschr. <b>250</b> , 326, 1932 . . . . .	13
Gulácsy, Zoltán von. Über den Calciumgehalt der roten Blutkörperchen im menschlichen Blute. I. Biochem. Zeitschr. <b>251</b> , 162, 1932 . . . . .	27
Schönberger, Stefan. Über den Calciumgehalt der roten Blutkörperchen im menschlichen Blute. II. Biochem. Zeitschr. <b>251</b> , 167, 1932 . . . . .	33
Poldermann, Josef. Über die Einheitlichkeit der prosthetischen Gruppe der Hämoglobine verschiedener Herkunft. Biochem. Zeitschr. <b>251</b> , 452, 1932 . . . . .	39
Azódi, Zoltán. Über die Darstellung von kristallisiertem Hämoglobin aus Menschenblut. Biochem. Zeitschr. <b>252</b> , 219, 1932 . . . . .	47
— — Über den Schwefelgehalt des Hämoglobins des Menschen. Biochem. Zeitschr. <b>252</b> , 387, 1932 . . . . .	51
Dénes, Anna. Über die Lichtabsorption des Globinhämochromogens und über seine Verwendbarkeit zur Bestimmung des Farbstoffgehaltes des Blutes. Biochem. Zeitschr. <b>255</b> , 378, 1932 . . . . .	57
Mosonyi, Ladislaus. Über die Verteilung des Zuckers im Blute und über die Zuckerpermeabilität der roten Blutkörperchen. Biochem. Zeitschr. <b>256</b> , 308, 1932 . . . . .	67
Sebesta, Vilma. Über die Lichtabsorption des Kohlenoxydhämoglobins. Biochem. Zeitschr. <b>260</b> , 187, 1933 . . . . .	87
Pomothy, Rudolf von. Beiträge zur Physiologie überlebender Säugtierherzen. Biochem. Zeitschr. <b>260</b> , 192, 1933 . . . . .	92
Herzog, Alfred. Über die eisenhaltige Komponente des Blutfarbstoffes und ihre Synthese mit Globin zu Hämoglobin. (Vorläufige Mitteilung.) Biochem. Zeitschr. <b>260</b> , 213, 1933 . . . . .	101
— — Über die prosthetische Gruppe des Blutfarbstoffes, deren kristallinische Isolierung und deren Synthese mit nativem Globin zu Hämoglobin. Biochem. Zeitschr. <b>264</b> , 412, 1933 . . . . .	103
— — Über kristallisiertes synthetisches Kohlenoxydhämoglobin. Biochem. Zeitschr. <b>264</b> , 431, 1933 . . . . .	123
Simonovits, Stefan. Über eine neue Mikro-Glykogenbestimmungsmethode. Biochem. Zeitschr. <b>265</b> , 437, 1933 . . . . .	127

## IV

Herzog, Alfred. Über Methyl- und Äthylester des Hämatoprosthetins und einer Verbindung von der Formel $C_{34}H_{38}N_4O_4Fe$ und zur Frage der Kohlenstoffzahl der prosthetischen Gruppe des Blutfarbstoffes. Biochem. Zeitschr. <b>267</b> , 48, 1933 . . . . .	135
Schönberger, Stefan. Über die Lichtbrechung der Hämoglobine verschiedener Tierarten. Biochem. Zeitschr. <b>267</b> , 57, 1933 . . . . .	145
Sebesta, Vilma und Alfred Herzog. Über die Lichtabsorption von Oxy- und Kohlenoxydhämoglobin in neutraler Lösung. Biochem. Zeitschr. <b>267</b> , 157, 1933 . . . . .	153
Brückner, Josef. Über ein mit Ameisensäure dargestelltes Hämin. Biochem. Zeitschr. <b>268</b> , 181, 1934 . . . . .	163
Herzog, Alfred. Vergleichende Untersuchungen über die Lichtabsorption des Hämatoprosthetins, seiner reduzierten Form, CO-Verbindung und seines Ammoniakhämochromogens. Biochem. Zeitschr. <b>268</b> , 260, 1934	169
Brückner, Josef. Über eine empfindliche und spezifische Reaktion des Ergosterins. Biochem. Zeitschr. <b>270</b> , 346, 1934 . . . . .	175
Aszódi, Zoltán und Josef Pélyi. Tierische Kolorimetrie. IX. Mitteilung: Über die spezifisch-dynamische Wirkung von Eiweiß. Biochem. Zeitschr. <b>270</b> , 389, 1934 . . . . .	179
— — Tierische Kalorimetrie. X. Mitteilung: Über die spezifisch-dynamische Wirkung der Fette. Biochem. Zeitschr. <b>270</b> , 419, 1934 . . . . .	209

## Paul Hári.

Wohl kaum einen würdigeren Platz zur Erhaltung seines Andenkens konnten wir finden, als dieses Heftchen, eine Fortsetzung der „Arbeiten auf dem Gebiete der chemischen Physiologie“, mit deren Hilfe er viele Jahre hindurch die Forschungsergebnisse des unter seiner Führung gestandenen Institutes der gelehrten Welt, seinen Freunden und sonstigen Interessenten mitteilte. Diesen 19. Band hatte er eben begonnen, als ihn der Tod nach kurzem Leiden dahinraffte (10. Mai 1933).

*Paul Hári* wurde im Jahre 1869 in Budapest geboren. Seinen Studien oblag er teils in Budapest, teils in Wien, und teils in Berlin, wo er bei *Boas* arbeitete und sie auch beendete. Er ließ sich zuerst in Budapest als praktizierender Arzt nieder und widmete seine freie Zeit wissenschaftlichen Untersuchungen. Um seine wissenschaftlichen Kenntnisse auf breitere Grundlagen zu stellen, arbeitete er damals am pathologischen und pharmakologischen Institut der Universität Budapest. Im Jahre 1902 wurde er dann an der pharmakologischen Lehrkanzel, der damals Prof. *Bókay* vorstand, zum Assistenten ernannt, nahm dann nach einigen Jahren die gleiche Stelle am experimentell-pathologischen Institut und am physiologischen Institut bei Prof. *Tangl* ein, wo er sich auch im Jahre 1907 habilitierte. Im Jahre 1915 übernahm er das Institut für physiologische und pathologische Chemie.

Es findet sich in der Biochemie wohl kaum ein Gebiet, auf welchem *Hári* oder zumeist auf Grund seiner Intentionen seine Schüler nicht gearbeitet hätten. Vornehmlich aber befaßte er sich mit zwei Lieblingsgebieten, die er mit außerordentlicher Sorgfalt bearbeiten ließ und die ihn auch zu einem großen Sachkenner dieser Gebiete werden ließen. Das eine dieser Gebiete war der Energie- und Stoffwechsel, das andere der Blutfarbstoff. Welches dieser beiden Wissenszweige ihn mehr reizte, konnten wir nie ergründen. Seine Vorliebe für den Energie- und Stoffwechsel ließ sein Lehrer *Tangl* in ihm erwachen. In gemeinsamen Arbeiten der beiden letzteren entstanden dann jene Pläne, die zur Konstruktion neuer Kalorimeter führten, mit Hilfe deren sich dann eine Reihe neuer Gesetzmäßigkeiten herausarbeiten ließ. Das neueste dieser Kalorimeter, das ebenso wie die früheren auf Kompensations-



prinzip aufgebaut war, ist in größerem Format gehalten und *Hári* konnte gerade noch das Ergebnis der ersten Experimente mit Hilfe dieses von ihm in jahrelanger mühsamer Arbeit konstruierten Apparates erleben.

Als *Hári* den Stoffwechsel an winterschlafenden Fledermäusen untersuchte, arbeitete er noch mit bescheidenen Apparaten. Später ging er zum *Zuntz-Geppertschen* Respirationsapparat über; dann zum *Rubnerschen* Kalorimeter, führte nachher seine Untersuchungen am *Tanglschen* Kalorimeter und schließlich auch mit seinem Kalorimeter aus. Mit Hilfe seiner Ergebnisse warf er eine Reihe von Problemen auf, die er mit der ihn auszeichnenden besonderen kritischen Begabung und großen Ausdauer untersucht hatte. Die Zahl und Mannigfaltigkeit seiner Untersuchungen und Probleme auf dem Gebiete des Energie- und Stoffwechsels lassen *Hári* als einen gründlichen Beherrscher dieser schweren, viel Zeit, Mühe und Geduld erfordernden Methoden erscheinen und weisen darauf hin, daß er diese Methodik als die geeignetste zur Lösung der betreffenden großen Probleme hielt. Nach Untersuchung der Wirkung großer Blutverluste befaßte er sich mit dem Problem der Beeinflussung von Energie- und Stoffwechsel durch die Bluttransfusion. Die Untersuchung der Kohlenhydrate, Eiweißstoffe, der Temperatur der einverleibten Nährstoffe auf den Energieumsatz waren nur Vorstudien seiner für spätere Zeit mit dem neuen Kalorimeter geplanten Untersuchungen, die einer tieferen Ergründung der spez. dyn. Wirkung gelten sollten. Auch zur Lösung der die Adrenalin- und Phlorrhizinglucosurie betreffenden Probleme zog er Stoff-, Energie- und Gaswechselversuche heran, und wir können auch jene Arbeiten als klassisch bezeichnen, in welchen er die Wirkung von chronischer Unterernährung, von Rückenmarkdurchschneidung und rektaler Ernährung untersuchte.

Die Kriegsjahre brachten eine entscheidende Wendung in seiner Arbeitsrichtung. Die innige Freundschaft und das Zusammenarbeiten mit *Tangl* hatten ihn vorher vollständig in den Dienst von Energie- und Stoffwechsel gestellt, so daß er die anderen Gebiete der Biochemie, die ihm im Anfang seiner Tätigkeit in seinen Assistentenjahren so vielseitig beschäftigt hatten, zeitweise vernachlässigen mußte. Der Mangel an den nötigen Mitteln und Hilfskräften während des Krieges zwangen ihn, nach neuen Forschungsgebieten Ausschau zu halten, und er fand ein solches auf dem Gebiet des Blutfarbstoffes, das seine Veranlagung in bezug auf präzises Arbeiten zu voller Geltung kommen ließ. Ausdauer und Sorgfalt sind wahrlich staunenswert, mit welchen *Hári* damals das neue Spektrophotometer auskalibrierte, um bei den in seinen Versuchen erhaltenen Ziffern höchste Genauigkeit erwarten zu können. Schon seine erste Arbeit auf diesem Gebiet läßt eine tiefe Erfassung des Problems erkennen. Er führt in dieser Arbeit, die sich mit der Lichtabsorption von Oxyhämoglobin befaßt, den Begriff der spezifischen Extinktionskoeffizienten in das Blutfarbstoffgebiet ein,

der einen quantitativen Vergleich der Lichtabsorptionskurven gestattet. Dieser Arbeit schlossen sich dann weitere über die Lichtabsorption des reduzierten Hämoglobins, Methämoglobins und Hämatoporphyrins an, und die in diesen Arbeiten der Wissenschaft übermittelten Daten sind noch heute in voller Geltung.

Des öfteren beschäftigte sich *Hári* auch mit interessanten medizinischen Fällen. So sei auf seine Arbeiten hingewiesen, die die Porphyrinurie und Pentosurie zum Gegenstand hatten. Sehr interessant ist auch jene Arbeit, in denen er die Darstellung eines zu den Harnfarbstoffen gehörenden Kondensationsproduktes beschrieb.

Die unter seinem Namen erschienenen Arbeiten hat *Hári* experimentell auch ausnahmslos selbst ausgearbeitet. Durch seine Schüler ließ er verschiedene biochemische Probleme bearbeiten, und wenn hier auch die Experimente seine Schüler ausführten, so war er über diese durch dauerndes Referieren stets orientiert. Die Initiative ging auch bei diesen Arbeiten zumeist von ihm aus, so daß im wahrsten Sinne des Wortes unter seiner Leitung gearbeitet wurde.

Trotz der großen Inanspruchnahme in seinem engeren Kreise durch Lehrtätigkeit und wissenschaftliche Arbeit fand *Hári* noch immer Zeit, auch weiteren Kreisen gegenüber durch sein Lehrbuch und seine zusammenfassenden Darstellungen hervorzutreten. Jeder, der die „Physiologische und pathologische Chemie“ von *Hári* benutzte, die nun schon in mehreren Auflagen sowohl in deutscher als auch ungarischer Sprache erschienen ist, sei es zum Lernen, sei es zum Nachschlagen, konnte sich von der Trefflichkeit dieses Buches überzeugen, das in ziemlich kurzer Darstellung doch alle Fragen zur Geltung kommen läßt und volle Orientierung bietet. Seiner kritischen Begabung und seiner Wahrheitsliebe entsprach es, wenn er sich in diesem Buche nur auf Tatsachen und auf Anschauungen stützte, von deren Richtigkeit er tief überzeugt war, und mit außerordentlicher Gründlichkeit verfolgte er stets die neuesten Forschungen, mit denen er dann die Neuauflagen bereicherte. Von seinen zusammenfassenden Darstellungen, zu denen *Hári* infolge seiner bekannten kritischen Fähigkeit des öfteren aufgefordert worden war, können wohl folgende als am besten gelungen angesehen werden: Kalorimetrische Verbrennung, über Kompensationskalorimetrie (Biol. bzw. biochem. Arbeitsmethoden von *Abderhalden*), in den Jahresberichten mehrere Jahre hindurch über „Harn“ und „Physiologie und Pathologie der Niere“. Hervorgehoben zu werden verdienen auch einige seiner theoretischen Arbeiten, die dauernden wissenschaftlich-literarischen Wert haben, so die vom Fieber, vom abnorm tiefen respiratorischen Quotienten, von Berechnungsarten kalorimetrischer Versuche.

Auf der gleichen Höhe wie als Wissenschaftler stand *Hári* als Mensch. Seine unglaubliche Arbeitskraft, sein hervorragendes Pflicht-

gefühl, sein umfassendes Wissen und tiefer Forschungstrieb fesselten ihn von früh bis manchmal tief in die Nacht hinein an das Laboratorium. Er war immer der erste im Institut und oft auch der letzte. In seiner Tätigkeit als Hochschullehrer war ihm die wissenschaftlich-experimentelle Arbeit Erholung, Unterhaltung und Bedürfnis. Unermüdlich war er nicht nur bei seinen eigenen Experimenten, sondern auch dann, wenn seine Schüler sich an ihn wegen eines Rates wendeten, und er hatte seinen Schülern gegenüber, wann immer, Zeit. Mit außerordentlicher Ausdauer ging er der Ergründung neuer Probleme nach, und dieselbe Ausdauer zeigte er auch dann, wenn es sich darum handelte, diese Probleme dem Verständnis anderer näher zu bringen. Und diese große Arbeitsfreude und Unermüdlichkeit entsprangen einem tiefen Wissensdrang und großer Wahrheitsliebe, und es entsprach auch voll diesen seinen Eigenschaften, wenn er bei seinen Schülern den gleichen Arbeitseifer verlangte und sie in eine Arbeitsrichtung wies, in der der Phantasie immer nur eine sehr bescheidene Rolle zukam. Er reihte Ziffern an Ziffern und Tatsachen an Tatsachen, und die Herausarbeitung der letzteren galt ihm als das alleinige Ziel. Folgerungen zog er nur selten und erst dann, wenn sich durch das vorhandene Tatsachenmaterial kaum mehr eine andere Möglichkeit des Schlusses ergab, und wir können auf Grund dieses Vorgehens seine Arbeiten wohl als klassisch bezeichnen. Seine Forschungsergebnisse können als feste Pfeiler der Wissenschaft gelten. Einmal als richtig Erkanntes wurde von ihm auch fanatisch verteidigt. Begeisterung für Wahrheit, Gerechtigkeit und Ehrlichkeit forderte er auch von seinen Schülern, und er war trotz seiner Ruhe und sonstigen Zurückgezogenheit immer bereit, gegen jedermann für die Wahrheit zu kämpfen.

Sein menschliches Wesen zeichneten Güte und Geduld aus. Diese Tugenden offenbarten sich vorzüglich in seinem Verhältnis zu seinen jüngsten Schülern. Er kannte bei der Arbeit keinen Unterschied zwischen Lehrer und Schüler und letztere konnten bei *Hári* nicht nur immer zu Worte gelangen, sondern wurden von *Hári* auch mit besonderer Vorliebe unterstützt. Seine Zuvorkommenheit konnte jeder genießen, der sich mit Ernst und Hingabe seiner Arbeit widmete. Mit einem besonderen Sinne brachte er seinen Schülern Liebe zur Wissenschaft bei und erläuterte ihnen des öfteren ein Problem von seinen Anfängen bis zu voller Entfaltung. Diesen geschilderten menschlichen Vorzügen verdankte er es neben seinen großen kritischen Fähigkeiten, daß er dauernd von einem größeren Stabe von Mitarbeitern umgeben war und diese jahrelang bei ihm ausharrten. Seine Schüler verehrten in ihm neben dem Meister auch den vorbildlichen Menschen, und es gehörte keineswegs zu den Seltenheiten, daß sich Schüler, die längst dem Institut entwachsen und in angesehenen Stellungen waren, noch aus dem Auslande an ihn um Rat wendeten, wenn es galt, wichtigere Fragen zu

entscheiden. Seine Kritik wurzelte in einem tiefgehenden Wissen, scharfer Logik, großer Erfahrung und hingebender Menschenliebe. Er war klassisch sowohl als Gelehrter als auch als Richter.

Diese Tugenden lassen uns *Hári* als einen Menschen auf hohem, ethischem Niveau erscheinen, der die Fackel der Wissenschaft kraftvoll in der Hand hielt, als Person aber immer in bescheidener Zurückgezogenheit verblieb. Der Fanatiker und Kämpfer der Wissenschaft *Paul Hári* wird uns immer in vorbildlicher Erinnerung bleiben.

*Z. Aszódi.*

*Sonderabdruck*  
aus „*Biochemische Zeitschrift*“ **248**, 208, 1932.  
Verlag von *Julius Springer*, Berlin W 9.

# Über die Kalibrierung der Orientierungsskale von Spektralapparaten.

Von  
Georg Neumann.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungarischen  
Universität Budapest.)

(Eingegangen am 18. März 1932.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In den Mitteilungen<sup>1</sup> aus diesem Institut wurde im Laufe der Jahre auf mehrere Fehlerquellen hingewiesen, durch die die Genauigkeit der spektrophotometrischen Bestimmungen beeinträchtigt wird. Eine weitere solche Fehlerquelle, in der Kalibrierung der Orientierungsskale der Apparate gelegen, soll nachstehend erörtert werden.

Von Paul Hári<sup>2</sup> wurde vor mehr als einem Jahrzehnt ausgeführt, daß man für die Lichtabsorption eines Farbstoffs auf derselben Spektralstelle, wenn sie an verschiedenen Spektralphotometern, doch unter identischen Versuchsbedingungen bestimmt wird, stets denselben Wert erhalten muß. Diese Ausführungen, fußend auf Parallelbestimmungen der Extinktionskoeffizienten von Blut- und Hämoglobinlösungen mittels eines alten Königschen und eines neueren nach Martens und Grünbaum modifizierten Königschen Apparats wurden einige Jahre später von Charnass<sup>3</sup> angegriffen.

Charnass behauptet, daß die jeweilige, für je einen Farbstoff bzw. je eine Spektralstelle charakteristische Lichtabsorptionskonstante an jedem Apparat eigens festgestellt werden muß, und die Konzentration der betreffenden Farbstofflösung erst auf Grund dieser Konstante bestimmt werden kann. Es erübrigt sich, auf die Unhaltbarkeit dieses Standpunktes genauer einzugehen; es wird genügen, darauf hinzuweisen, daß man auf

---

<sup>1</sup> E. Keve, diese Zeitschr. 201, 439, 1928; M. Schlesinger, ebendasselbst 235, 70, 1931; E. Keve, ebendasselbst 224, 347, 1930.

<sup>2</sup> P. Hári, ebendasselbst 95, 266, 1919.

<sup>3</sup> D. Charnass, Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. Abt. IV, Teil 4, Heft 4, S. 1128.

Grund eines ähnlichen Gedankenganges auch beim Arbeiten mit Polari-  
metern, Refraktometern, ja sogar mit analytischen Waagen usw. für jeden  
Apparat entsprechende Konstanten wird feststellen müssen! Es ist selbst-  
verständlich, daß die Werte, die man mittels zweier, wenn auch tadellos  
justierter und kalibrierter Spektrophotometer erhält, nicht auf beliebige  
Dezimalstellen übereinstimmen; doch ist ähnliches auch bezüglich zweier  
feinster analytischer Waagen der Fall. Wie an den Waagen hat auch an  
den Spektrophotometern die Genauigkeit, mit der sich ein Apparat her-  
stellen und sich mit ihm arbeiten läßt, ihre Grenzen, demzufolge sich bei  
der Gewichtsbestimmung Fehler von einigen Zehntel Prozenten, bei der  
Spektrophotometrie aber solche von einigen ganzen Prozenten ergeben.  
Aus alledem folgt aber nicht, daß jedem Spektrophotometer eine Art  
Individualität zukäme.

Da es sich in den Versuchen von *Hári* insgesamt um fünf Blut-  
farbstofflösungen und bloß um zwei Spektralstellen handelte, wurde  
mir die Aufgabe zuteil, diese Untersuchungen auf eine größere Zahl  
von Spektralstellen und, um gewisse Fehlerquellen auszuschließen, auf  
solche Farbstofflösungen auszudehnen, deren Lichtabsorption nicht,  
wie die des Blutes bzw. des Hämoglobins, während einer längeren  
Beobachtungsdauer sich durch Belichtung, durch chemische Um-  
setzungen usw. ändern kann. Im Verlauf dieser Untersuchungen gelang  
es mir, die Eingangs erwähnte systematische Fehlerquelle aufzudecken,  
an die eigentlich nicht gedacht werden konnte.

#### Einrichtung der Versuche.

Untersucht wurden an beiden oben erwähnten Spektrophotometern  
Lösungen von Kaliumpermanganat, Kupfersulfat und Kaliumbichromat.  
Bei dem steilen Verlauf der Absorptionskurven dieser Stoffe (die aber,  
um fortiori zu beweisen, absichtlich gewählt wurden) mußten je nach der  
Spektralstelle, an der oben abgelesen werden sollte, sehr verschieden kon-  
zentrierte Lösungen in den Trog (des alten) bzw. in die Röhre (des neuen  
Apparats) eingefüllt werden, um nicht zu niedrige oder zu hohe Extinktions-  
koeffizienten zu erhalten, die nach den vielfältigen Erfahrungen in diesem  
Institut mit erheblichen Fehlern belastet sein können. Von meinen Werten  
war 0,458 der niedrigste und 1,326 der höchste. Als Lichtquelle diente  
an beiden Apparaten je eine starke Osram-Opallampe, deren Licht durch  
eine kreisförmige 15 mm im Durchschnitt haltende Blende trat. Der Okular-  
spalt hatte die Breite, die seinerzeit von *Hüfner* empfohlen wurde (siehe  
hierüber weiter unten). Der Objektivspalt wurde an beiden Apparaten  
0,1 mm breit genommen; nur im Gebiet der kurzwelligen Strahlen wurde  
er auf 0,25 mm erweitert. Bei der nicht ganz bereinigten Frage über die  
Gültigkeit des *Beerschen* Gesetzes bei der Verwendung von gemischtem  
Licht war ich gezwungen, an beiden Apparaten bei derselben Schichtdicke  
abzulesen, und, da der Trog des alten Apparats unabänderlich so beschaffen  
ist, daß der betreffende Extinktionskoeffizient sich auf eine Schichtdicke  
von 10 mm bezieht, durfte ich am neuen Apparat von allen zur Verfügung  
stehenden Beobachtungsröhren nur die 20 mm lange mit eingelegtem  
10 mm dicken Glasklotz benutzen. Insgesamt habe ich zwei Lösungen  
von Kaliumpermanganat und je drei Lösungen von Kaliumbichromat

und Kupfersulfat untersucht. Das Spektralgebiet, über das sich die Ablesungen erstreckten, konnte naturgemäß nicht für alle drei Stoffe dasselbe sein, denn die Lichtabsorption ist am Bichromat im langwelligen, am Kupfersulfat im kurzwelligen Gebiet so gering, daß in diesen Gebieten bei einer Schichtdicke von 10 mm auch in möglichst konzentrierten Lösungen keine verwendbaren Extinktionskoeffizienten erhalten werden können.

#### Die Ergebnisse der Versuche.

Die Bestimmungen führten zu dem recht überraschenden Ergebnis, daß die an den beiden Spektrophotometern erhaltenen Werte teilweise recht große Verschiedenheiten aufwiesen. In nachstehender Tabelle I habe ich die an den oben genannten Lösungen ermittelten Extinktionskoeffizienten zusammengestellt bzw. auch den prozentualen Unterschied zwischen den an beiden Apparaten erhaltenen Werten berechnet. Diese Unterschiede sind teilweise weit größer als dem zulässigen Ablesungsfehler entspricht, und sind in der Tabelle I, soweit sie 3% überschreiten, durch Fettdruck hervorgehoben. Daß dieser Befund kein zufälliger, sondern ein systematischer war, geht aus der meistens leidlichen Übereinstimmung der Ergebnisse der parallelen Versuchsreihen hervor; daß aber diese Übereinstimmung nicht besser ist, läßt sich einfach aus den unvermeidlichen Ablesungsfehlern erklären, die nicht geringer als auf 1 bis 3% geschätzt werden können, und die die oben erwähnten systematischen Fehler je nach ihrer Richtung bald größer, bald aber kleiner erscheinen lassen.

Von der festen Überzeugung ausgehend, daß im Gegensatz zur *Charnassschen* Auffassung zwei Apparate verschiedener, jedoch richtiger Konstruktion, wenn sie tadellos justiert und kalibriert sind, praktisch identische Extinktionskoeffizienten liefern müssen, ging ich daran, nach der Quelle des Fehlers zu suchen. Sie konnte darin gelegen sein, daß 1. einer der beiden Apparate oder beide falsch justiert waren, 2. der Spektralausschnitt, in dem die Bestimmungen ausgeführt waren, in den zwei Apparaten nicht gleich breit war, 3. woran am wenigsten gedacht werden konnte, an einem Apparat oder an beiden die Kalibrierung der Orientierungsskala stellenweise falsch war.

Zu 1. Eine Neujustierung beider Apparate wurde kurz vor dem Beginn meiner Versuche in derselben Werkstatt (*Schmidt* u. *Hänsch* in Berlin), aus der auch die Apparate herkommen, vorgenommen, und hat sich als tadellos erwiesen.

Zu 2. An einer Farbstofflösung, deren Lichtabsorption längs einer größeren Strecke des Spektrums angenähert gleich stark ist, d. h. ihre Absorptionskurve auf dieser Strecke nur wenig gegen die Abszissenachse geneigt ist, weisen die Extinktionskoeffizienten keinen belangvollen Unterschied auf, wenn der Okularspalt und demzufolge auch der Spektralausschnitt an *zwei* Apparaten oder zu zwei ver-



Tabelle I.  
Kaliumpermanganat.

Mitte des Spektral- ausschnittes $\mu\mu$	Lösung I				Lösung II			
	Konzentration	Extinktionskoeffizient			Konzentration	Extinktionskoeffizient		
		am alten Apparat	am neuen Apparat	am alten Apparat größer (+) kleiner (-) %		am alten Apparat	am neuen Apparat	am alten Apparat größer (+) kleiner (-) %
618,9	n/50	0,757	0,766	- 1,1	n/50	0,754	0,775	- 2,7
605,5	n/50	0,867	0,891	- 2,6	n/50	0,875	0,876	- 0,1
598,8	n/50	0,967	0,992	- 2,5	n/50	0,953	0,997	- 4,4
583,2	n/100	0,892	0,971	- 8,1	n/100	0,881	0,965	- 8,7
575,5	n/200	0,911	0,998	- 8,7	n/200	0,920	0,990	- 8,4
570,0	n/200	1,279	1,322	- 3,2	n/200	1,258	1,326	- 5,1
565,4	n/330	0,832	0,849	- 2,0	n/330	0,814	0,841	- 3,2
560,8	n/330	0,856	0,869	- 1,5	n/330	0,835	0,869	- 3,9
555,8	n/330	0,956	0,999	- 4,3	n/330	0,953	0,986	- 3,3
550,7	n/400	1,031	1,077	- 4,2	n/400	1,020	1,065	- 4,2
537,4	n/400	1,118	1,105	+ 1,1	n/400	1,100	1,096	+ 0,3
520,9	n/400	1,218	1,204	+ 1,1	n/400	1,203	1,204	- 0,0
515,5	n/400	1,007	1,016	- 0,8	n/400	1,008	1,006	+ 0,2
510,1	n/400	0,951	0,966	- 1,5	n/400	0,973	0,942	+ 3,2
500,7	n/400	0,863	0,849	+ 1,6	n/400	0,871	0,829	+ 5,0
499,6	n/400	0,843	0,801	+ 5,2	n/400	0,793	0,778	+ 1,9
497,8	n/400	0,754	0,752	+ 0,2	n/400	0,764	0,725	+ 5,3

Tabelle I (Fortsetzung).

Mitte des Spektral- aus- schnittes $\mu\mu$	Lösung I						Lösung II						Lösung III		
	Extinktionskoeffizient			Extinktionskoeffizient			Extinktionskoeffizient			Extinktionskoeffizient			Extinktionskoeffizient		
	Konzentration %/o	am alten Apparat	am neuen Apparat	am alten Apparat größer (+) kleiner (-) %/o	Konzentration %/o	am alten Apparat	am neuen Apparat	am alten Apparat größer (+) kleiner (-) %/o	Konzentration %/o	am alten Apparat größer (+) kleiner (-) %/o	Konzentration %/o	am alten Apparat	am neuen Apparat	am alten Apparat größer (+) kleiner (-) %/o	
Kupfersulfat.															
618,9	11,25	1,046	0,974	+ 7,3	11,25	1,030	0,983	+ 4,7	11,25	1,060	0,956	+ 10,8			
605,5	20,00	1,263	1,223	+ 3,2	20,00	1,283	1,232	+ 4,1	20,00	1,299	1,213	+ 7,0			
598,8	20,00	1,115	1,031	+ 8,1	20,00	1,096	1,032	+ 6,2	20,00	1,086	1,014	+ 7,1			
583,2	20,00	0,724	0,696	+ 4,0	20,00	0,716	0,678	+ 5,6	20,00	0,705	0,653	+ 7,9			
575,5	20,00	0,568	0,554	+ 2,5	20,00	0,558	0,545	+ 2,3	20,00	0,556	0,520	+ 6,9			
570,0	20,00	0,475	0,458	+ 3,7	20,00	0,498	0,476	+ 4,6	20,00	0,475	0,441	+ 7,7			
Kaliumbichromat.															
550,7	4,17	1,040	1,053	- 1,2	10,76	0,766	0,859	- 10,8	10,76	0,763	0,855	- 10,7			
537,4	1,21	1,147	1,179	- 2,7	4,17	1,038	1,056	- 1,7	4,17	1,017	1,052	- 3,3			
520,9	0,69	0,953	0,965	- 1,2	1,21	1,148	1,149	- 0,0	1,21	1,140	1,155	- 1,3			
515,5	0,43	0,800	0,828	- 3,3	0,69	0,941	0,942	- 0,1	0,69	0,945	0,929	- 1,7			
510,1	0,24	0,714	0,765	- 6,6	0,43	0,805	0,808	- 0,3	0,43	0,800	0,796	- 0,5			
500,7	0,24	0,758	0,811	- 6,5	0,24	0,740	0,738	- 0,2	0,24	0,721	0,761	- 5,2			
499,6	0,24	0,758	0,811	- 6,5	0,24	0,778	0,783	- 0,6	0,24	0,787	0,840	- 6,3			

schiedenen Gelegenheiten an *einem* Apparat verschieden breit genommen wird. Handelt es sich hingegen um eine steil verlaufende Absorptionskurve bzw. um ein steil verlaufendes Stück, wo der Anstieg oder Abfall zudem noch kein gleichmäßiger ist, so wird man je nach der Breite des Okularspaltes ungleiche Extinktionskoeffizienten erhalten müssen.

In nachstehender Abb. 1 ist auf Grund meiner eigenen Ablesungen dargestellt, wie steil die Absorptionskurve des Kupfersulfats von Rot nach Grün *abfällt*, die des Kaliumbichromats von Grün nach Blau *ansteigt*; daselbst ist auch der von Rot bis Grün *ansteigende* und von Blaugrün bis Blau *abfallende* Schenkel der Absorptionskurve des Kaliumpermanganats

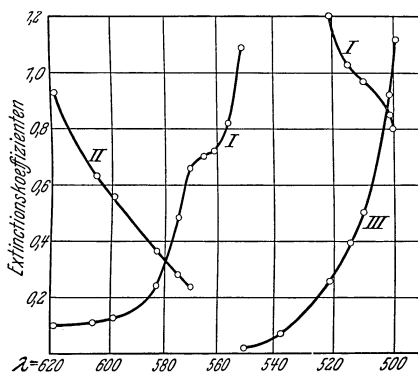


Abb. 1.

I = Kaliumpermanganat. II = Kupfersulfat. III = Kaliumbichromat.

abgebildet. In dieser Abbildung sind bezüglich jeder einzelnen Farbstofflösung die an den verschiedenen Konzentrationen ermittelten Extinktionskoeffizienten auf je eine einzige, bezüglich der drei Farbstofflösungen natürlich verschiedene, und zwar solche Konzentration umgerechnet, daß die höchsten Stellen der drei Kurven ungefähr die gleiche Höhe haben, denn nur auf diese Weise konnten die drei Kurven in einer Abbildung untergebracht werden.

Nun konnten aber die aus Tabelle I ersichtlichen Unterschiede *nicht* auf diese Weise entstanden sein, denn auf möglichste Gleichheit des Okularspaltes habe ich sorgfältig geachtet. Der Okularspalt ist zwar an unseren beiden Apparaten nicht meßbar verstellbar, und ist demzufolge die Ausmessung der Breite des Spektralausschnittes mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden; immerhin konnte aber soviel erreicht werden, daß der Spektralausschnitt bei Natriumlicht am alten Apparat 9,5, am neuen 9,0  $\mu\mu$  breit war, also kein wesentlicher Unterschied bestanden hatte.

Zu 3. An Farbstofflösungen mit den oben erwähnten steil verlaufenden Absorptionskurven kommt es nicht nur infolge einer Ungleichheit des Okularspaltes, d. h. des Spektralausschnittes, zu Un-

stimmigkeiten zwischen den an zwei Apparaten erhaltenen Extinktionskoeffizienten, sondern selbstverständlich auch infolge etwaiger Fehler in der Kalibrierung der Orientierungsskala. Die Kalibrierung von Spektralapparaten wird bekanntlich so vorgenommen, daß man hintereinander eine Reihe von Emissionslinien von bekannter Wellenlänge in die Mitte des Okularspaltes einstellt, und dabei jedesmal den Stand der Orientierungsskala abliest. Indem man dann die Zahlen der Orientierungsskala auf die Abszissenachse eines Koordinatensystems, die entsprechenden Wellenlängen aber als Ordinaten aufträgt, erhält man durch Vereinigung der Schnittpunkte eine Kurve, von der man mit Recht erwarten kann, daß mit ihrer Hilfe auch die interpolierten Stellen genau ausgewertet werden können. Die Kalibrierung der von mir benutzten Apparate wurde seinerzeit von *Hári*<sup>1</sup> ausgeführt, und wurden zu diesem Zwecke neben mit Wasserstoff und Helium gefüllten *Geissler*-schen Röhren auch Flammen- und Funkenspektren liefernde Einrichtungen verwendet. Als im Laufe der Jahre die Kalibrierung der Sicherheit halber öfter wiederholt wurde, fanden sich die Emissionslinien des Wasserstoffs und des Heliums stets genau auf derselben Stelle der Orientierungsskala, während dies betreffs der auf andere Weise erzeugten, in der Regel meist schwächeren Linien, nicht mit derselben Genauigkeit der Fall war. *Dann ist aber keine Gewähr für die Richtigkeit der Kalibrierungskurve gegeben: es konnte die Kalibrierungskurve des einen Apparats falsch sein, und es konnten die Kalibrierungskurven beider Apparate in verschiedener Richtung und in verschiedenem Grade falsch sein.*

Ich konnte auch daran denken, die Kurve nur durch die mit Wasserstoff und Helium erhaltenen Punkte zu ziehen, was jedoch wieder den schweren Nachteil eines allzugroßen Abstandes zwischen den fixen Punkten bei der graphischen Interpolation gehabt hätte. Auf Anraten des Herrn Prof. *Rybar*, dem auch an dieser Stelle bestens gedankt sei, ergab sich ein Ausweg auf folgender Weise. Bezeichnet man mit  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  und  $\lambda_3$  die Wellenlängen der zur Kalibrierung verwendeten drei Strahlen, mit  $n_1$ ,  $n_2$  und  $n_3$  die durch die Kalibrierung ermittelten entsprechenden drei Stellen der Orientierungsskala, so bestehen die Gleichungen

$$\begin{aligned} n_1 &= k_1 + k_2 \lambda_1 + k_3 \lambda_1^2 \\ n_2 &= k_1 + k_2 \lambda_2 + k_3 \lambda_2^2 \\ n_3 &= k_1 + k_2 \lambda_3 + k_3 \lambda_3^2 \end{aligned}$$

wobei  $k_1$ ,  $k_2$  und  $k_3$  Konstanten sind, deren Wert sich aus den obigen drei Gleichungen berechnen läßt. Umgekehrt lassen sich dann mit Hilfe

<sup>1</sup> *P. Hári*, diese Zeitschr. 82, 229, 1917; 95, 266, 1919.

dieser drei Konstanten alle Stellen der Orientierungsskale berechnen, die den Wellenlängen im Bereich zwischen  $\lambda_1$  und  $\lambda_3$  entsprechen. In der geschilderten Weise erhält man auch die Konstanten für die Strecke  $\lambda_3$  bis  $\lambda_5$  und berechnet die diesem Bereich entsprechenden Orientierungsskalenstellen usw.

Nachstehend sei das Beispiel einer solchen Berechnung ausgeführt. Sie ist recht umständlich, da auch mit neunstelligen Zahlen gerechnet werden muß, wobei die gewöhnlichen Logarithmentafeln nicht verwendet werden können. An dem von mir benutzten neueren Spektrophotometer entsprachen

der Wellenlänge	492,2	$\mu\mu$	die Skalenstelle	3392
„	„	501,57	$\mu\mu$	„
„	„	587,56	$\mu\mu$	„
				3509,5
				4264,5

Laut Vorangehendem bestehen die Gleichungen

$$3392 = k_1 + 492,2 k_2 + 492,2^2 k_3 \quad \text{(I)}$$

$$3509,5 = k_1 + 501,57 k_2 + 501,57^2 k_3 \quad \text{(II)}$$

$$4264,5 = k_1 + 587,56 k_2 + 587,56^2 k_3 \quad \text{(III)}$$

Gleichung (I) von Gleichung (II) abgezogen fällt  $k_1$  weg, und es verbleibt:

$$117,5 = 9,37 k_2 + 9311,625 k_3,$$

woraus

$$k_2 = \frac{117,5 - 9311,625 k_3}{9,37} = 12,5400 - 993,77 k_3 \quad \text{(IV)}$$

Gleichung (I) von Gleichung (III) abgezogen fällt  $k_1$  ebenfalls weg, und es verbleibt:

$$872,5 = 95,36 k_2 + 102965,914 k_3,$$

woraus

$$k_2 = \frac{872,5 - 102965,914 k_3}{95,36} = 9,14953 - 1079,76 k_3 \quad \text{(V)}$$

Aus Gleichung (IV) und (V) ist

$$12,5400 - 993,77 k_3 = 9,14953 - 1079,76 k_3,$$

woraus

$$k_3 = \frac{3,39047}{85,99} = -0,0394286.$$

Diesen Wert von  $k_3$  in Gleichung (IV) eingesetzt, erhält man

$$k_2 = 12,5400 - 993,77 \cdot (-0,0394286) = 51,72296.$$

Und den Wert  $k_2$  in Gleichung (I) eingesetzt

$$3392 = k_1 + 492,2 \cdot 51,72296 + 492,2^2 \cdot (-0,0394286),$$

woraus

$$k_1 = 3392 - 492,2 \cdot 51,72296 - 492,2^2 \cdot (-0,0394286) = -12514,0.$$

Nachdem ich auf diese Weise alle in der Tabelle I verzeichneten Wellenlängen in die nunmehr richtig ausgewerteten Orientierungsskalenstellen umgerechnet hatte, ergaben sich stellenweise recht erhebliche Unterschiede zwischen alter und neuer Kalibrierung, die zwar die oben behandelten Unstimmigkeiten zwischen den an den zwei

Tabelle II.

Mitte des Spektral- ans- schnittes $\mu$	Kaliumpermanganat				Kupfersulfat				Kaliumbichromat						
	Konzentration	Extinktionskoeffizient			Konzentration %	Extinktionskoeffizient			Konzentration %	Extinktionskoeffizient					
		am alten Apparat	am neuen Apparat	am alten Apparat größer (+) kleiner (-) %		am alten Apparat	am neuen Apparat	am alten Apparat größer (+) kleiner (-) %		am alten Apparat	am neuen Apparat	am alten Apparat größer (+) kleiner (-) %			
618,9	n/50	0,787	0,774	+ 1,6	12,78	1,070	1,097	- 2,4							
605,5	n/50	0,933	0,903	+ 3,3	20,00	1,198	1,236	- 3,0							
598,8	n/50	0,987	0,971	+ 1,6	20,00	1,045	1,042	+ 0,2							
583,2	n/100	0,915	0,924	- 0,9	20,00	0,695	0,687	+ 1,1							
575,5	n/100	0,890	0,880	+ 1,1	20,00	0,588	0,572	+ 2,8							
570,0	n/100	1,228	1,200	+ 2,3	20,00	0,489	0,489	+ 0							
565,4	n/330	0,816	0,837	- 2,5											
560,8	n/330	0,833	0,849	- 1,8											
555,8	n/330	0,895	0,902	- 0,7											
550,7	n/400	0,955	0,977	- 2,2					10,76	0,703	0,725	- 3,0			
537,4	n/400	1,109	1,129	- 1,7					4,17	0,801	0,820	- 2,3			
520,9	n/400	1,133	1,214	- 2,5					1,21	1,134	1,145	- 0,9			
515,5	n/400	0,933	1,005	- 2,2					0,69	0,910	0,936	- 2,7			
510,1	n/400	0,922	0,950	- 2,9					0,43	0,821	0,836	- 1,7			
500,7	n/400	0,817	0,809	+ 0,9					0,24	0,782	0,791	- 1,1			
499,6	n/400	0,763	0,781	- 2,3					0,24	0,824	0,835	- 1,3			

Apparaten erhaltenen Werten verursachen konnten, jedoch keineswegs geeignet sind, die im Laufe der Jahre aus diesem Institut mitgeteilten Werte in erheblicherem Grade zu ändern.

Unter Benutzung der nunmehr richtig kalibrierten Orientierungsskalen wiederholte ich die Ablesungen an je einer Lösung von Kaliumpermanganat, Kupfersulfat und Kaliumbichromat, und erhielt die in Tabelle II zusammengestellten Ergebnisse. Wie aus den Daten dieser Tabelle ersichtlich, waren die Abweichungen zwischen dem am alten und am neuen Apparat erhaltenen Extinktionskoeffizienten nur mehr ausnahmsweise so groß bzw. größer (in der Tabelle durch Fettdruck hervorgehoben) als dem zulässigen Versuchsfehler von 3% in maximo entspricht, woraus hervorgeht, daß man bei der Kalibrierung der Orientierungsskale eines Spektralapparats am besten fährt, wenn man *einige Skalenstellen mit Hilfe ganz verlässlicher Emissionslinien feststellt, und die dazwischenliegenden Stellen durch die oben erörterte Art der Berechnung, nicht aber durch graphische Interpolation ermittelt.*

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *Hári* ausgeführt.

---

*Sonderabdruck*  
aus „*Biochemische Zeitschrift*“ **250**, 326, 1932.  
Verlag von *Julius Springer*, Berlin W 9.



## Ein Kalorimeter für größere Tiere.

Von  
Paul Hári.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 28. Mai 1932.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Vor bald 20 Jahren wurde von *F. Tanql* ein elektrisches Kompensationskalorimeter „für kleine Tiere“ (Ratten bis zu 200 g) konstruiert, und von ihm<sup>1</sup> kurz, später von mir<sup>2</sup> ausführlich beschrieben. Ein größerer Apparat, in dem z. B. auch Hunde bis zu einem Gewicht von etwa 12 kg untersucht werden können, entstand noch zu *Tanqls* Lebzeiten, mußte aber nach Maßgabe der zahlreichen Fehlerquellen, die sich der Reihe nach anlässlich der jahrelang fortgesetzten Versuche offenbarten, von mir wiederholt umgebaut werden.

Das Prinzip des kleinen Kompensationskalorimeters ist kurz das Folgende. Von zwei kupfernen Hohlzylindern, die durch angelötete Konstantandrähte miteinander, durch je einen Kupferdraht aber mit einem Galvanometer verbunden sind, ist der eine zur Aufnahme des Versuchstieres eingerichtet, im anderen ist ein elektrischer Widerstand untergebracht, durch den man elektrischen Strom fließen lassen und dadurch Wärme erzeugen kann. Setzt man ein Versuchstier in den Apparat ein, so werden durch die vom Tier durch Strahlung ausgegebene Wärme die in der Wand dieses Hohlzylinders befindlichen Lötstellen erwärmt, und es entsteht, da die Temperatur im anderen Hohlzylinder bzw. an den daselbst befindlichen Lötstellen unverändert geblieben ist, ein Thermostrom, kenntlich am Ausschlag des Galvanometers. Läßt man gleichzeitig durch den Widerstand auf der anderen Seite elektrischen Strom fließen, so wird auch hier Wärme erzeugt; auch hier entsteht ein Thermostrom, doch von entgegengesetzter Richtung. Ob nun das Galvanometer nach der einen, oder nach der anderen Richtung ausschlagen wird, hängt davon ab, welcher der beiden Thermostrome das Übergewicht hat; man kann aber die Stärke des kompensierenden Stromes mittels eines dazwischengeschalteten Rheostaten derart regulieren, daß überhaupt keine Thermostrome entstehen, und zwar ist dies der Fall,

---

<sup>1</sup> Diese Zeitschr. **53**, 21, 1913.

<sup>2</sup> Abderhaldens Handb. d. biolog. Arbeitsmethod. Abt. IV, Teil 10.

wenn die vom Tier auf der einen Seite durch Strahlung ausgegebene Wärme gleich ist der Wärme, die auf der anderen Seite im Widerstand erzeugt wurde. Da sich letztere aus der Größe des eingesetzten Widerstandes und der Intensität des durchfließenden elektrischen Stromes berechnen läßt, ist mithin auch die vom Tier durch Strahlung ausgegebene Wärme bekannt.

Das Prinzip des größeren Apparats ist dasselbe, wie das des kleineren, und sind beide auch zur Untersuchung des Gaswechsels eingerichtet, also sind es sogenannte Respirationskalorimeter. Nachstehend seien nur die Einzelheiten mitgeteilt, in denen sich der neue Apparat vom alten unterscheidet.

### Tierraum und Kompensationsvorrichtung.

Der wärmeempfindliche Teil des Kalorimeters wird durch die beiden Kupferkasten *T* und *Ko* (Abb. 1) gebildet, und zwar dient der erstere als Tierraum, im zweiten wird die kompensierende Wärme erzeugt. Kupferkasten *T* ist aus 0,4 mm starkem, an der Innenfläche überall geschwärztem Kupferblech angefertigt. Sein Boden ist eben, seine Decke ist halbkreisförmig gewölbt. Er ist 53 cm hoch, 40 cm breit und 70 cm tief. Seine vordere Wand fehlt, und wird durch einen auf den vorderen Rand aufgelöteten, 25 mm breiten, aus 3 mm starkem Kupferblech angefertigten Rahmen *R*, sowie durch eine 10 mm dicke Spiegelglasscheibe *SG* (Abb. 2) ersetzt, welche letztere

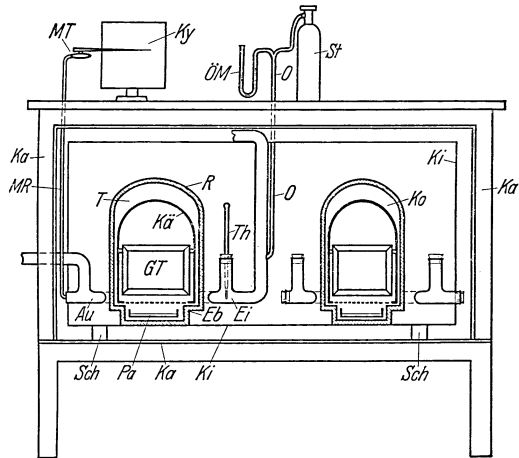


Abb. 1.

auf den eingefetteten Rahmen *R* aufgedrückt, den Kupferkasten nach vorn luftdicht verschließt. Etwa 25 cm von diesem entfernt, ist rechts neben ihm ein zweiter Kupferkasten *Ko* von genau denselben Dimensionen und aus demselben Material aufgestellt. In seinem Innenraum befindet sich der elektrische Widerstand (150 Ohm), durch den elektrischer Strom aus einer Akkumulatoranlage von 25 Zellen geschickt werden, und so Wärme in verschiedenen, berechenbaren Mengen erzeugt werden kann, da in den Stromkreis auch eine Rheostat und ein Amperemeter eingeschaltet ist. An neun korrespondierenden Stellen (der Decke, der Seitenwände, des Bodens und der Hinterwand) sind die beiden Kupfer-

kasten durch je einen 2 mm dicken, mit Silber aufgelöteten Konstantandraht miteinander verbunden. Vom Scheitelpunkt der beiden Kupferkasten, gleich hinter den beiden Rahmen geht je ein Kupferdraht zu den Polen eines empfindlichen Drehspulengalvanometers mit vertikaler Ablesungsvorrichtung. In den Stromkreis ist auch ein Kommutator eingeschaltet.

#### Isolierung der beiden Kupferkasten gegen die Umgebung.

Mit dem hinteren Ende ist der Kupferkasten  $T$  so weit durch einen entsprechenden Ausschnitt eines 3 cm dicken vertikal aufgestellten Holzbrettes  $Br$  gesteckt, daß nur der weit breitere Rahmen  $R$  über das Niveau des Brettes hervorragte (Abb. 2). Dadurch, daß der Rahmen auf das Brett aufgeschraubt ist, wird der Kupferkasten  $T$  vorn in seiner Lage fixiert. Der Kupferkasten ist nach allen Seiten (vorn ausgenommen) von einem aus 0,8 mm starkem Aluminiumblech angefertigten Kasten  $Al$  umgeben, der mit den umgebogenen Rändern an die hintere Fläche des Holzbrettes  $Br$  genagelt ist. Zwischen Kupfer- und Aluminiumwand ist allseits ein etwa 5 cm breiter Raum gelassen, der Luft als Isolierschicht enthält. (Die neun Konstantandrähte sind nicht auf kürzestem Wege zwischen den beiden Kupferkasten ausgespannt, sondern verlaufen alle zwischen Aluminium- und Kupferwand nach vorn und biegen erst hier gegen die andere Seite um.) Der zweite Kupferkasten  $Ko$  ist, wie der andere, an das Holzbrett befestigt und ebenfalls von einem Aluminiumkasten umgeben. Beide Kupfer- und Aluminiumkasten sind in eine 140 cm breite, 80 cm hohe und 80 cm tiefe hölzerne Kiste  $Ki$  (Abb. 1) so eingebaut, daß das Holzbrett  $Br$  seine Vorderwand bildet. Vorn sind beide Kupferkasten, wie erwähnt, an die hintere Fläche des Holzbrettes  $Br$  fixiert, rückwärts aber durch untergelegte starke Ebonitleisten in ihrer Lage erhalten. Der Zwischenraum zwischen den einander zugekehrten Aluminiumwänden, sowie allseits zwischen Aluminium- und Holzwand ist mit Korkabfällen ausgefüllt. Die ganze Holzkiste  $Ki$  ist über zwei starke Holzschienen  $Sch$  in einen 175 cm breiten, 115 cm hohen und 115 cm tiefen Holzkasten  $Ka$  hineingeschoben, der an der Innenfläche überall mit 6 mm dicken Asbestplatten belegt ist und seinerseits auf einem festen, etwa 60 cm hohen Gestell aufruht. Da dieser Kasten nach allen Richtungen hin größer dimensioniert ist als Kiste  $Ki$ , bleibt zwischen beiden allseits ein etwa 10 cm breiter Raum übrig, dessen Luft, wenn nötig, durch die Flügel eines Ventilators durchgemischt werden kann. Der Motor, der den Ventilator antreibt, ist auf die rechte Außenwand des Kastens  $Ka$  aufmontiert; die Achse des Ventilators ist durch diese Wand gesteckt. Dem Kasten  $Ka$  fehlt die Vorderwand; sie ist durch zwei Glasscheiben ersetzt, die in je einen breiten hölzernen Rahmen eingefaßt, in Fugen verschiebbar sind. Verschiebt man beide

Scheiben nach rechts, so ist Kupferkasten *T'* zugänglich, und es kann das Versuchstier eingesetzt oder herausgenommen werden; verschiebt man die eine Scheibe nach rechts, die andere nach links, so ist Kasten *Ka* auch nach vorn (natürlich nicht luftdicht) verschlossen.

#### Einrichtung zur Bestimmung des Gaswechsels.

Nahe dem vorderen Rande sind die beiden Seitenwände des Kupferkastens *T'* von je einer Öffnung durchbohrt. Durch die rechts befindliche Öffnung tritt luftdicht eine 22 mm weite Kupferröhre *Ei* (in Abb. 1), die dem Eintritt der Ventilationsluft dienend, im Innern des Kastens sofort nach hinten umbiegt (Abb. 2) und knapp vor seiner Hinterwand endigt. Vor ihrem Eintritt ist diese Röhre mit einem Ansatzstück *Th* zur Aufnahme eines Thermometers (Abb. 1) versehen. An die Ränder

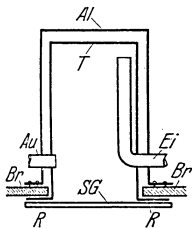


Abb. 2.

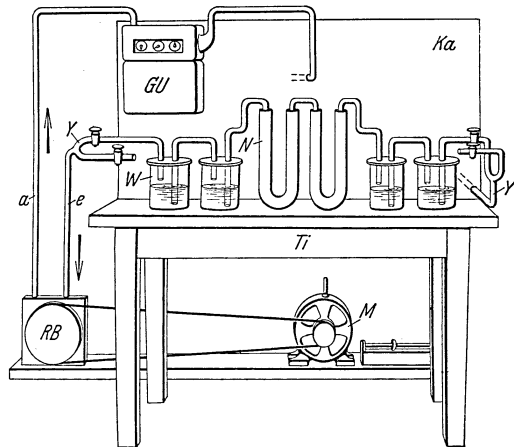


Abb. 3.

der links befindlichen Öffnung ist mit ihrer Mündung eine zweite ebenso weite Kupferröhre *Au* luftdicht aufgelötet; sie dient zum Austritt der Ventilationsluft, und ist ebenfalls mit einem Ansatzstück versehen. Die Temperatur der austretenden Luft wird an einem Thermometer abgelesen, das im Innenraum des Kupferkastens *T'* so aufgehängt ist, daß sich sein Quecksilberbehälter genau vor der Austrittsöffnung befindet. Der zweite Kasten *Ko* ist genau so mit Eintritts- und Austrittsrohr versehen, obzwar diese Seite nur zur Erzeugung der kompensierenden Wärme dient.

Der zur Ventilation des Tierraums nötige Luftstrom wird durch einen von einem Motor *M* angetriebenen „Rotatory Blower“ *RB* (in Abb. 3) besorgt. Beide sind auf das untere Fach des Tisches *Ti* aufmontiert, auf dem sich die Absorptionsgefäße befinden. Die Luftein- und -austrittsröhren *e* und *a* des Blowers sind durch luftdicht aufgeschraubte eiserne Röhren bis über die Höhe der Tischplatte ver-

ängert. Die vom Blower angetriebene Luft tritt durch eine an die linke Seitenwand des Kastens *Ka* befestigte trockene Gasuhr *GU*, dann durch ein etwa 20 m langes, 22 mm weites Kupferrohr, das bei einer Öffnung in der linken Seitenwand des Kastens *Ka* in dessen Innenraum eintretend, über und unter der Kiste *Ki* zahlreiche Windungen beschreibt, um sich dann mit dem Kupferrohr *Ei* zu verbinden, durch das die Ventilationsluft in den Tierraum eintritt. Das Kupferrohr wurde so lang genommen, damit die zum Tier eintretende Luft diejenige Temperatur anzunehmen Gelegenheit habe, die im Zwischenraum zwischen Kiste *Ki* und Kasten *Ka* zu Zwecken des Versuchs erzeugt wird. An der Saugseite des Blowers sind die mit Schwefelsäure bzw. mit Natronkalk beschickten Absorptionsgefäße, an diese ist aber das kupferne Rohr *Au* angeschlossen, durch das die Ventilationsluft aus dem Tierraum austritt. In die Wand dieses weiten Rohres ist eine etwa 4 cm lange, schmale Kupferröhre eingelötet; bei dieser Röhre werden am Beginn und am Ende eines Versuchs (bzw. einer Versuchsperiode) Proben der Ventilationsluft entnommen und der Analyse in einem *Haldaneschen* Apparat zugeführt.

Die Änderung, die der Wasserdampfgehalt des Tierraums vom Beginn des Versuchs (der Versuchsperiode) bis zum Ende erfährt, ist bei der Berechnung der durch Wasserverdampfung erfolgenden Wärmeabgabe des Tieres nicht zu vernachlässigen. Diese Änderung wird an einem *Lambrechtschen* Hygrometer abgelesen, der auf einem Haken am metallenen Rahmen der weiter unten zu erwähnenden Glastür *GT* aufgehängt wird.

Die Absorptionsgefäße sind auf dem Tisch *T* an der linken Seitenwand des Kastens *Ka* aufgestellt (Abb. 3). Die konzentrierte Schwefelsäure ist in *Williamschen* Flaschen *W* enthalten, deren Körper 15 cm hoch ist, der Natronkalk aber in U-förmigen Glasröhren *N* von etwa 6 cm lichter Weite, deren beide Schenkel je 60 cm lang sind, so daß die Kohlensäure absorbierende Schicht 120 cm in der Länge mißt. Dabei ist das U-Rohr derart rechtwinklig abgebogen (in Abb. 3 nicht wiedergegeben), daß die eine Hälfte vertikal zu stehen, die andere aber horizontal auf der Tischplatte zu liegen kommt. An den beiden offenen Enden ist jedes U-Rohr auf etwa 2 cm verjüngt, damit man es mittels der Gummistopfen von gewöhnlichen Dimensionen verschließen könne. Mit einer benachbarten *Williamschen* Flasche wird das weit höhere U-Rohr durch eine Glasröhre verbunden, die vom hochgelegenen Halse des U-Rohres ausgehend zum horizontal abgehenden Ast der *Williamschen* Flasche heruntersteigt. Die erwähnten Dimensionen und die Röhrenform mußten den Natronkalkgefäßen gegeben werden, einerseits um den eingefüllten Natronkalk (etwa  $1\frac{1}{2}$  kg) möglichst vollkommen auszunutzen, andererseits um ein angefülltes Gefäß auch bis zu 18 bis

24 Stunden lang verwenden zu können. Von den Absorptionsgefäßen sind in der üblichen Reihenfolge (vom Tierraum an gerechnet zwei Flaschen mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , zwei U-Röhren mit Natronkalk und wieder zwei Flaschen mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) zwei Systeme nebeneinander aufgestellt. Dadurch, daß Y-Röhren *Y* mit je zwei Glashähnen eingeschaltet sind, wird es ermöglicht, die beiden Systeme abwechselnd zu benutzen und die Versuche in Perioden von beliebiger Dauer geteilt auszuführen. Benachbarte Röhrenendigungen (Metall-Metall, Glas-Glas, Glas-Metall) sind untereinander durch engpassende Gummischlauchstücke verbunden. Keine der andersartigen Verbindungen, die im Laufe der Jahre ausprobiert wurden, hat sich bewährt.

#### Vorrichtung zur direkten Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs.

In das Kupferrohr, durch das die Ventilationsluft im Zwischenraum zwischen Kiste *Ki* und Kasten *Ka* gegen den Tierraum strömt, ist das Ende einer engeren Röhre *O* seitlich eingelötet; sie steigt durch eine Öffnung an die Decke des Kastens und ist dort mit dem Schaft eines T-Stückes verbunden; das eine Ende des T-Stückes ist mit einem Ölmanometer *ÖM*, das andere Ende mittels einer engen Glasröhrenleitung mit einem komprimierten Sauerstoff enthaltenden Stahlbehälter *St* verbunden. Man läßt den Sauerstoff aus dem Stahlbehälter mit einer Geschwindigkeit einströmen, daß das Öl in beiden Schenkeln des Manometers vom Anfang des Versuchs bis zu dessen Ende gleich hoch bleibt.

#### Der Tierkäfig; Einrichtung zum Sammeln des Harns.

Um zu verhindern, daß das Tier mit der Innenfläche des Kastens, insbesondere aber mit den Stellen, an denen die Konstantandrähte außen angelötet sind, in Berührung komme, bzw. diese anwärme, ist folgende Vorkehrung getroffen. Das Tier hält sich nicht frei im Innern des Kupferkastens *T* auf, sondern in einem Käfig *Kä* (Abb. 1), der in den Kasten hineingeschoben, zwischen sich und der kupfernen Innenwand überall einen Zwischenraum von etwa  $2\frac{1}{2}$  cm frei läßt. Seitenwand und Hinterwand sind aus verzinnem Kupferblech, die gewölbte Decke aus starkem verzinnem Kupferdraht angefertigt. Die Vorderwand des Käfigs fehlt und ist durch eine eingehängte Glastür *GT* (siehe weiter unten) ersetzt. Auch der Boden fehlt und wird durch ein Drahtnetz ersetzt, das auf drei zwischen den unteren Rändern des Käfigs ausgespannten Spangen ruht. Um den vom Tier während des Aufenthalts im Kalorimeter entleerten Harn ohne Verlust sammeln zu können, ist folgende Vorrichtung angebracht. Dadurch, daß die Wände des Kupferkastens *T* vom Boden an gerechnet bis zu einer Höhe von 5 cm beider-

seits 3 cm tief rechtwinklig eingebuchtet sind, *Eb* in Abb. 1, entsteht rechts und links je eine 3 cm breite Schiene, deren Länge der Tiefe des Kastens entspricht; auf diesen beiden Schienen ruht, durch je eine schmale Ebonitplatte isoliert, der Käfig, dessen Boden durch das oben erwähnte Drahtnetz gebildet wird. Durch die oben erwähnte Einbuchtung wird auch bewirkt, daß unter dem Käfig ein Raum verbleibt, in dem eine flache, kupferne, innen verzinnte Schüssel so weit hineingeschoben werden kann, daß der vom Hund gelassene Harn, an welcher Stelle immer er durch die Lücken des Drahtnetzes fließt, immer in die Schüssel fällt, und sich unter dem Paraffinöl *Pa* ansammelt, das man vor Versuchsbeginn in die Schüssel eingefüllt hat.

#### Einrichtung zur Registrierung der Bewegungen des Versuchstieres.

Hauptsächlich um das Versuchstier von der den Tierraum nach vorn abschließenden Spiegelglasscheibe *SG* möglichst fern zu halten, und es doch während der ganzen Versuchsdauer beobachten zu können, ist an Stelle der fehlenden Vorderwand des Käfigs eine bis zu drei Viertel seiner Höhe reichende, von einem breiten Metallrahmen eingefasste, leicht ein- und aushängbare Glastür *GT* angebracht (Abb. 4). Das

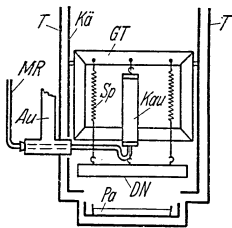


Abb. 4.

Drahtnetz, auf dem sich das Tier befindet, liegt während eines Versuchs nicht auf den oben erwähnten Spangen auf, sondern wird bei dem vorderen Rand durch zwei Stahlspiralen *Sp*, die bei schweren Tieren stärker, bei leichten schwächer genommen werden müssen, etwa 3 bis 4 cm hoch gehoben, indem ihr oberes Ende an den oberen Rand des metallenen Rahmens der Glastür *GT* festgeschraubt, ihr unteres Ende aber in je einen Haken am vorderen Rande des Drahtnetzes *DN* eingehängt ist. Auf diese Weise wirkt das Drahtnetz wie ein einarmiger Hebel, der bei jeder Bewegung des Versuchstieres ein bis zwei pendelartige Bewegungen in vertikaler Richtung ausführt, die wie folgt registriert werden. Ein etwa 15 cm langer Schlauch aus schwarzem Kautschuk *Kau* (Wanddicke 1 mm, lichte Weite 3 cm) ist an beiden Enden über je einen Gummistopfen gezogen; in dem vom Schlauch und den beiden Gummistopfen eingeschlossenen Raum befindet sich eine Spirale aus 1 mm dickem Stahldraht, dessen Enden durch den oberen bzw. unteren Gummistopfen gezogen außen in je einem Ring endigen. Bei diesen beiden Ringen ist der Schlauch in vertikaler Stellung oben und unten in je einen Haken eingehängt, die an den metallenen

Rahmen der obenerwähnten Glastür  $GT$  bzw. an den vorderen Rand  $DN$  des Drahtnetzes gelötet sind. Eine 6 mm weite Messingröhre  $MR$  ist mit dem einen Ende durch die Bohrung des unteren Gummistopfens gesteckt, mit dem anderen Ende tritt sie durch den Gummistopfen am Ansatzstück der Röhre  $Au$  aus dem Tierraum hervor, bei der auch die Ventilationsluft den Tierraum verläßt; steigt dann durch eine Öffnung auf die Decke des Kastens zu einer *Mareyschen* Trommel  $MT$  empor (Abb. 1). Das Messingrohr  $MR$  besteht aus mehreren Stücken, die durch dickwandige Vakuummischlauchstücke miteinander verbunden sind. Da die Luft im Innern des dünnwandigen Kautschukschlauches, der Messingröhre und der *Mareyschen* Trommel ein zusammenhängendes, abgeschlossenes Ganzes bildet, muß jede Bewegung des Versuchstieres bzw. des Drahtnetzes zu einer Volumenveränderung der eingeschlossenen Luft bzw. zu einer entsprechenden Bewegung des Schreibhebels führen, der die Bewegungen auf einem vorüberrotierenden berußten Kymographionpapier  $Ky$  registriert.

#### Vorrichtung zum Arbeiten bei verschiedenen Versuchstemperaturen.

Im Zwischenraum zwischen Kasten  $Ka$  und Kiste  $Ki$  ist die Kühl- und Heizvorrichtung untergebracht, die man benutzen kann, um in dem Tierraum eine gewählte Versuchstemperatur konstant zu erhalten. Doch muß bemerkt werden, daß es, wenn durchführbar, zweckmäßiger und bequemer ist, diese Temperatur im ganzen Raume, in dem das Kalorimeter untergebracht ist, zu erzeugen; denn, wenn im Innern des Kastens  $Ka$  gekühlt oder geheizt wird, können infolge etwaiger verschieden rascher Abkühlung bzw. Erwärmung der Kupferkasten  $T$  und  $Ko$  Thermoströme entstehen, die dann störend wirken. Die *Kühlvorrichtung* besteht in einer 14 m langen 12 mm weiten Kupferschlange, die bei einer Öffnung an der rechten Seite des Kastens  $Ka$  in dessen Innenraum eintritt, bei einer anderen ihn verläßt. Die Schlange ist in Intervallen von je 1 cm in ihrer ganzen Länge mit vertikal aufgelöteten, 35 mm im Durchmesser haltenden Kupferscheiben versehen; sie beschreibt vier Windungen entlang der beiden Seitenwände und der Hinterwand des Kastens, und ist an den beiden Enden mit je einer Bleiröhre verbunden; die eine dieser Bleiröhren ist an die Wasserleitung angeschlossen, bei der anderen fließt das Kühlwasser ab. Als *Heizvorrichtung* dienen 0,4 mm starke Chrom-Nickelspiralen, die über je einen hölzernen Rahmen gespannt, rechts und links in dem Raum zwischen Kasten  $Ka$  und Kiste  $Ki$  untergebracht und an die städtische Leitung angeschlossen sind. Der Quecksilberbehälter eines Kontaktthermometers reicht durch eine Öffnung in der Decke des Kastens  $Ka$



in dessen Innenraum hinein. Dadurch, daß ein Relais in den Stromkreis des auf die gewünschte Temperatur eingestellten Thermometers eingeschaltet ist und den Heizstrom abwechselnd schließt und öffnet, werden auch die beiden Kupferkasten bei der gewünschten Temperatur erhalten.

**Vorrichtung zur Fütterung des Tieres im Kalorimeter ohne Unterbrechung des Versuchs bzw. ohne Öffnung des Tierraumes.**

Die Spiegelglasscheibe *SG*, durch die der Tierraum (Kasten *T*) nach vorn abgeschlossen wird, ist nahe zu ihrem oberen Rande von einer kreisrunden, etwa 12 cm im Durchmesser haltenden Öffnung durchbohrt. Durch diese Öffnung ist von außen eine etwa 16 cm lange, aus  $1\frac{1}{2}$  mm starkem Messingblech angefertigte, der ganzen Länge nach in ein oberes und ein unteres Fach geteilte, am äußeren Ende durch eine Stirnplatte geschlossene Büchse von quadratischem Querschnitt ( $7 \times 7$  cm) bis etwa zur halben Länge hineingeschoben. Tiefer läßt sich die Büchse nicht hineinschieben, da sie etwa in der Mitte ihrer Länge einen quer auf die Längsachse aufgelöteten flachen Messingring trägt, der ringsherum um etwa 1 cm über den Rand der Öffnung der Glasscheibe ragend, diese von außen ringförmig bedeckt. Dasselbe ist der Fall betreffs eines zweiten flachen Messingringes, der von innen her über die in den Tierraum hineinragende Hälfte der Büchse geschoben ist und die innere Fläche der Glasscheibe längs des Randes ihrer Öffnung ringförmig bedeckt. Dadurch, daß die beiden Messingringe miteinander fest verschraubt sind, zwischen Metall und Glas aber außen und innen breite, flache Gummiringe eingelegt sind, bildet der Hohlraum der Büchse mit dem Tierraum ein gegen außen luftdicht abgeschlossenes Ganzes.

Durch Stopfbüchsen gedichtet treten zwei 7 mm dicke Messingstangen leicht beweglich durch die Stirnwand am außen befindlichen Ende der Büchse in ihren Innenraum, und zwar die eine in das obere, die andere in das untere Fach, und enden in je eine vertikal stehende  $1\frac{1}{2}$  mm starke Messingplatte. An dem inneren, im Tierraum befindlichen Ende der Büchse ist eine Tür angebracht, die um eine auf den Rand der Büchsenmündung aufgelötete Achse drehbar ist. Durch ein enges Loch in der Platte des oberen Faches tritt ein starker Messingdraht, der mit dem nach innen zugekehrten Ende in einen kleinen auf die Innenfläche der Tür aufgelöteten Ring eingehakt und diesseits und jenseits der Platte (je einige Zentimeter weit von ihr entfernt) ringförmig gebogen ist. Drückt man die obere Messingstange hinein, so stößt die Platte an den nach innen zu gelegenen Ring, wodurch die Tür geöffnet und gleichzeitig auch das dem Tier zu verabreichende, in geeignete Form gebrachte

Futter, das vor dem Beginn des Versuchs bei ganz herausgezogener Stange in das obere Fach eingebracht wurde, in den Tierraum hineingestoßen wird. Zieht man die obere Messingstange wieder heraus, so stößt die Platte an den nach außen zu gelegenen Ring und zieht beim Draht die Tür wieder zu. Diese Vorrichtung macht es möglich, dem Tiere nach Ablauf einer gewissen Zeit ein zweites Mal Futter zu reichen. Zu diesem Behuf wird vor dem Beginn des Versuchs auch in das untere Fach Futter eingebracht; will man dem Tier die zweite Portion reichen, so wird durch Hineindrücken der oberen Messingstange die Tür der Büchse wieder geöffnet, durch Hineindrücken der unteren Stange aber das Futter hineingestoßen.

#### Die Berechnung der vom Tier durch Strahlung ausgegebenen Wärme aus der kompensierenden Wärme.

Ist die Kompensation vollkommen, was daran zu erkennen ist, daß das Galvanometer keinen Thermostrom anzeigt, so ist, ideale Gleichheit der beiden Kupferkasten vorausgesetzt, die vom Tier durch Strahlung abgegebene Wärme gleich  $i^2 \cdot w \cdot 0,239 \cdot 60 (t_2 - t_1)$ , wobei mit  $i$  die Intensität des Kompensationsstromes bezeichnet ist, mit  $w$  der Widerstand, durch den dieser Strom geflossen ist, mit  $t_2 - t_1$  aber die Zeitdauer in Minuten, für die die Wärmeproduktion berechnet werden soll. Nun folgt aber aus dem Fehlen des Thermostromes wohl, daß die Temperatur auf beiden Seiten (im Tierraum und beim Kompensationswiderstand) die gleiche ist, jedoch durchaus nicht, daß diese Temperaturen rechts und links durch *dieselbe Menge* an ausgegebener Wärme erzeugt wurden; denn auch bei größter Sorgfalt in der Herstellung des Apparats sind Unterschiede in der Isolierung der beiden Kupferkasten, in der Beschaffenheit und der Anordnung der Lötstellen usw. unvermeidbar, und haben zur Folge, daß die zwei Kupferkasten durch dieselbe ausgegebene Wärmemenge ungleich stark erwärmt werden können, und umgekehrt, verschieden große Wärmemengen nötig sein können, um die beiden Kasten auf dieselbe Temperatur zu bringen. Diesen Umständen wird man gerecht, indem man am obigen Ausdruck noch einen Faktor  $\gamma$  anbringt, der experimentell ermittelt werden kann.

Um  $\gamma$  bestimmen zu können, wie dies in der erwähnten Mitteilung ausführlich beschrieben ist, wird auch im Tierraum ein genau bekannter Widerstand untergebracht, durch den elektrischer Strom von regulierbarer und bekannter Intensität gesendet werden kann. Die im Tierraume befindlichen Teile der Messingröhre  $MR$  und der zur Fütterung des Tieres dienenden Messingbüchse werden mit den beiden Enden des Widerstandes, ihre außen befindlichen Teile aber mit

den Polen einer zweiten Akkumulatorenreihe von 25 Zellen leitend verbunden, so daß durch die Widerstände im Kompensationsraum und im Tierraum je ein elektrischer Strom gesendet werden kann, die voneinander unabhängig sind. Die gesuchte Wärme ist dann gleich  $\gamma \cdot i^2 \cdot w \cdot 0,239 (t_2 - t_1)$ .

Andererseits wird es sich nur ausnahmsweise bzw. nur für eine kurze Zeit ergeben, daß das Galvanometer, durch das der Thermostrom angezeigt werden soll, keinen Ausschlag gibt, d. h. die im Kompensationswiderstand erzeugte, im obigen Sinne korrigierte Wärme genau gleich ist der vom Tier durch Strahlung abgegebenen Wärme. Von diesen Ausnahmefällen abgesehen wird man immer einen entweder nach rechts oder nach links gerichteten Ausschlag erhalten, teils weil die Kompensation nicht vollständig gelungen ist, daher das Galvanometer bei einem bestimmten Ausschlag verharrt, teils aber, weil die Wärmeabgabe des Tieres keine ganz gleichmäßige ist, daher der Ausschlag in einer langsamen oder rascheren Wanderung nach rechts oder nach links begriffen ist. Diesen Umständen wird man durch das Korrektionsglied  $\alpha (g_2 - g_1) + \beta \cdot g (t_2 - t_1)$  gerecht, in dem mit  $g_1$  bzw.  $g_2$  der Galvanometerausschlag am Beginn bzw. am Ende des Versuchs (der Versuchsperiode), mit  $g$  der für den ganzen Versuch (bzw. für die Versuchsperiode) berechnete mittlere Galvanometerausschlag, mit  $t_2 - t_1$  die in Minuten ausgedrückte Zeitdauer des Versuchs (der Versuchsperiode) bezeichnet ist,  $\alpha$  und  $\beta$  aber Konstanten bedeuten. Und zwar ist  $\alpha$  gleich der in Grammkalorien ausgedrückten Steigerung (Verringerung) der Wärmeproduktion auf der Tierseite, wenn der Galvanometerzeiger vom Beginn des Versuchs (der Versuchsperiode) bis zum Ende um 1 mm nach rechts (links) gerückt ist;  $\beta$  aber ist gleich dem während einer Minute bestehenden Wärmeplus (Minus) auf der Tierseite, das auf 1 mm des konstant gewordenen Galvanometerauschlags entfällt. Die Ermittlung dieser beiden Konstanten ist ebenfalls in der mehrfach erwähnten Mitteilung beschrieben. Hier sei nur, um die Größenordnung dieser Korrekturen zu demonstrieren, angeführt, daß an dem von mir benutzten Apparat  $\gamma = 1,067$ ;  $\alpha = 47$  g-cal;  $\beta = 0,60$  g-cal.

#### Beispiel eines im neuen Apparat ausgeführten Versuchs.

Um die Leistungsfähigkeit des Apparates zu zeigen, seien nachfolgend Ergebnisse und Berechnung eines Versuchs angeführt, der vor etwa einem Jahre an einem mittelgroßen hungernden Hunde in drei einander unmittelbar folgenden Perioden von je vierstündiger Dauer ausgeführt wurde. Anfangsgewicht betrug 10389,20 g, Endgewicht 10332,30 g, Anfangstemperatur 38,7<sup>0</sup>, Endtemperatur 38,9<sup>0</sup> C; Harn

und Kot wurden im Käfig nicht entleert. Der kompensierende Strom hatte die Intensität von 0,290 A.

Tabelle I enthält die auf den Gaswechsel bezüglichen Daten, sowie die Berechnung des Energieumsatzes aus dem direkt ermittelten Sauerstoffverbrauch und dem respiratorischen Quotienten; Tabelle II die Daten der direkten Kalorimetrie; Tabelle III die Berechnung des Energieumsatzes aus diesen Daten. Diesen Tabellen sei die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs aus den Ausgaben des Tieres und seiner Gewichtsveränderung während der Versuchsdauer vorausgeschickt. Wie zu ersehen, stimmt der so berechnete Wert mit dem direkt ermittelten (in Tabelle II) auf etwa 3% überein. Desgleichen stimmen die für den Energieumsatz aus dem Sauerstoffverbrauch berechneten Werte mit den durch direkte Kalorimetrie erhaltenen sowohl in den einzelnen Perioden wie auch namentlich in der ganzen Versuchsdauer gut überein.

Anfangsgewicht . . . . .	10 389,20 g
Ausgaben (CO <sub>2</sub> und H <sub>2</sub> O) während der ganzen Versuchsdauer abgezogen . . . . .	112,46 g
	10 276,74 g
Endgewicht . . . . .	10 332,30 g
Sauerstoffverbrauch während der ganzen Versuchsdauer . .	55,56 g

Tabelle I.

Periode	Wasser verdampft g	CO <sub>2</sub> -Ausgabe g	O <sub>2</sub> -Aufnahme		R.-Q.	Wärme- produktion keal
			g	Liter		
I	18,52	18,12	18,03	12,62	0,731	59,1
II	18,30	18,50	17,47	12,22	0,770	57,7
III	19,51	19,51	18,50	12,94	0,767	61,2
		Zusammen:	<b>54,00</b>			<b>178,0</b>

Tabelle II.

Periode	Galvanometerausschlag				Ventilationsluft			
	am Beginn der Periode	am Ende der Periode	durch- schnitt- lich	Änderung	Liter	Luft- druck	Tempe- ratur	Er- wärmung
	mm	mm	mm	mm		mm Hg	°C	°C
I	— 35	— 35	— 33,3	± 0	5933	755	22,8	3,0
II	— 35	— 28	— 33,5	+ 7	6050	754	23,9	3,4
III	— 28	— 14	— 30,8	+ 14	6335	754	24,4	3,8

Biochemische Zeitschrift Band 250.

22

Tabelle III.

Periode	Wärmeausgabe							Wärme- produktion ( $a + b + c - d$ )
	durch Strahlung				durch Wasserverdampfung $b$	durch Erwärmung der Ventilationsluft $c$	Korrektion* für die Änderung des Körpergewichts und der Körpertemperatur $d$	
	Kom- pensierende Wärme	$e$ -Korrektion	$\beta$ -Korrektion	Zusammen $a$				
kcal	kcal	kcal	kcal	kcal	kcal	kcal	kcal	
I	46,32	$\pm 0$	- 4,80	41,52	10,77	5,02	- 0,38	57,7
II	46,32	+ 0,33	- 4,69	41,96	10,65	5,86	- 0,38	58,9
III	46,32	+ 0,66	- 4,31	42,67	11,34	6,71	- 0,38	61,0
							Zusammen:	177,6

\* Für die ganze Versuchsdauer berechnet (siehe *P. Hári*, diese Zeitschr. 194, 91, 1928) und auf die Dauer der Periode umgerechnet.

Der erste Aufbau und der oft wiederholte Umbau des Apparates, ausgeführt in der mechanischen Werkstätte des Herrn *L. Köves* in Budapest, II. Keletigasse 24, verursachten sehr beträchtliche Ausgaben. Sie wurden gedeckt durch Zuwendungen von der Ungarischen Akademie der Wissenschaften in Budapest, von der *Ella Sachs-Plotz-Foundation* in Boston, und von der nach dem Grafen *Széchenyi* benannten Wissenschaftlichen Vereinigung in Budapest. Für diese Zuwendungen sei auch an dieser Stelle bester Dank ausgesprochen.

*Sonderabdruck*  
aus „*Biochemische Zeitschrift*“ **251**, 162, 1932.  
Verlag von *Julius Springer*, Berlin W 9.

# Über den Calciumgehalt der roten Blutkörperchen im menschlichen Blute. I.

Von

Zoltán von Gulácsy.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 23. Mai 1932.)

Der Frage, ob die roten Blutkörperchen Calcium enthalten oder nicht, kommt nicht nur ein theoretisches, sondern auch ein praktisches Interesse zu; hängt sie doch einerseits mit dem Problem der Ionen- bzw. Salzpermeabilität der tierischen Zelle (Zellbaut, Plasmahaut), andererseits mit wichtigen Feststellungen zusammen, die sich auf die unter gewissen Umständen pathognomonische Änderung des Calciumgehaltes des Blutplasmas beziehen. Sucht man sich diesbezüglich zu belehren, so wird man bei der Durchsicht der einschlägigen Literatur nicht klüger, denn *in den roten Blutkörperchen fanden Calcium:*

in wechselnden Mengen	keines
<i>Hamburger</i> <sup>1</sup> 1909, Rind, etwa 10 mg-% <i>Rona-Takahashi</i> <sup>2</sup> 1911, verschiedene Tiere, 2 — 4 mg-% <i>Heubner-Rona</i> <sup>3</sup> 1918, Katze, 0 bis 6 mg-% <i>Cowie-Calhoun</i> <sup>4</sup> 1919, Mensch, Rind 2 bis 5 mg-% <i>Jones-Nye</i> <sup>5</sup> 1921, Kind, 9 mg-% <i>Jones</i> <sup>6</sup> 1923, neugeborenes Kind, 5 mg-% <i>Cruickshank</i> <sup>7</sup> 1923, Hund, Kaninchen, 0,3 bis 1,3 bzw. 0,3 bis 0,5 mg-% <i>Jansen</i> <sup>8</sup> 1924, Mensch, 1,2 bis 2,4 mg-% <i>Anderson</i> <sup>9</sup> 1924, Kind, 3,1 bis 5,5 mg-% <i>Stanford</i> <sup>10</sup> 1925, Mensch, 1,4 bis 3 mg-%	<i>Abderhalden</i> <sup>11</sup> 1897 bis 1898, verschiedene Tiere <i>Lamers</i> <sup>12</sup> 1912, Mensch <i>Richter-Quittner</i> <sup>13</sup> 1921, ver- schiedene Tiere <i>Kramer-Tisdall</i> <sup>14</sup> 1922, Mensch

<sup>1</sup> *Hamburger*, Zeitschr. f. physik. Chem. 69, 663, 1909.

<sup>2</sup> *Rona-Takahashi*, diese Zeitschr. 31, 336, 1911.

<sup>3</sup> *Heubner-Rona*, ebendasselbst 98, 187, 1918.

<sup>4</sup> *Cowie-Calhoun*, J. of biol. Chem. 37, 504, 1919.

<sup>5</sup> *Jones-Nye*, ebendasselbst 47, 321, 1921.

<sup>6</sup> *Jones*, ebendasselbst 49, 187, 1921.

<sup>7</sup> *Cruickshank*, British J. of exp. pathol. 4, 213, 1923.

<sup>8</sup> *Jansen*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 144, 14, 1924.

<sup>9</sup> *Anderson*, British J. of child. des. 21, 33, 1925.

<sup>10</sup> *Stanford*, Biochem. J. 19, 710, 1925.

<sup>11</sup> *Abderhalden*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 521, 1897 und 25, 65, 1898.

<sup>12</sup> *Lamers*, Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol. 71, 393, 1912.

<sup>13</sup> *Richter-Quittner*, Wiener Arch. f. inn. Med. 2, 217, 1921.

<sup>14</sup> *Kramer-Tisdall*, J. of biol. Chem. 53, 241, 1922.

Diese diametralen Gegensätze können nur versuchstechnische Ursachen haben, und, ohne nach solchen in den einzelnen Mitteilungen zu fahnden, habe ich eine Reihe von Versuchen zur Lösung des scheinbar so einfachen und doch so schwierigen Problems ausgeführt. Versuchsfehler können

a) entweder daraus entstehen, daß die Verteilung von Calcium zwischen Blutflüssigkeit und Blutkörperchen zu irgendeinem Zeitpunkte zwischen Blutentnahme und Analyse unkontrollierbare Änderungen variierenden Ausmaßes erfährt; oder aber

b) daraus, daß die Calciumbestimmungen, wie sie für gewöhnlich ausgeführt werden, wohl für reine Lösungen oder für solche, in denen Calcium bloß von Magnesium getrennt werden muß, geeignet sind, jedoch in Gegenwart gewisser anderer Aschenbestandteile des Blutes mehr oder minder versagen. Die unter a) erwähnten Änderungen können, wie man sich leicht vorstellen kann, erfolgen, wenn man die Bestimmungen nicht am Plasma, sondern am Serum vornehmen will, und zu diesem Behufe das Blut gerinnen läßt, und sodann zuwartet, bis das Serum ausgepreßt wird. Dasselbe gilt auch, wenn man den Calciumgehalt der roten Blutkörperchen *direkt* bestimmen will, und sie zu diesem Behufe nach der bekannten Vorschrift plasmafrei zu waschen sucht.

Um alle diese Fehlerquellen zu vermeiden, habe ich in einer kleineren Anzahl im Jahre 1928 ausgeführter Versuche *den Calciumgehalt der Blutkörperchen nicht direkt bestimmt, sondern*, wie dies bereits vor mir manche Autoren taten, *aus dem des Vollblutes und des dazugehörigen Plasmas* auf Grund des relativen Volumens des Plasmas und der Blutkörperchen berechnet. Bezüglich der Analyse hielt ich mich an die Erfahrungen und Ratschläge des Herrn Prof. *W. L. Winkler* in Budapest, dem für die Erlaubnis, mir seine Erfahrungen nutzbar zu machen, auch an dieser Stelle bester Dank quittiert sei.

#### A. Methodik meiner Versuche.

Frisch der angestauten menschlichen Vena cubitalis durch eine Punktionsnadel entströmendes Blut wurde in zwei kleineren Zentrifugierröhrchen aufgefangen, die mit geschmolzenem Paraffinum solidum ausgegossen waren. Durch scharfes Zentrifugieren konnten auf leichte Weise je 1 bis 3 ccm Plasma erhalten, mittels einer graduierten Pipette abgehoben und in kleine Porzellantiegel eingegossen werden. Durch vorzeitiges Gerinnen gingen nur wenige Versuche verloren; allerdings mußte so rasch gearbeitet werden, daß bis zum Beginn des Zentrifugierens nicht mehr als etwa 2 Minuten vergingen; nach 2 bis 6 Minuten langem Zentrifugieren war das Plasma in der Regel noch nicht geronnen. Unmittelbar nachdem ich die Blutproben zur Gewinnung des Plasmas aufgefangen hatte, füllte ich je 2 ccm Vollblut in einen dritten und vierten Porzellantiegel, und sog auch Blut in zwei Hämatokritröhrchen (über letztere siehe weiter unten) auf.



Plasma und Blut in den Porzellantiegeln wurden mit wenig konz. HCl versetzt, über einer kleinen Flamme eingedampft, vorsichtig verascht, der Rest in einem Gasmuffelofen nicht zu stark geglüht, in einem Gemisch von je 10 bis 15 Tropfen konz. HCl und Wasser unter Erwärmen gelöst, durch Watte in ein kleines Becherglas (Fassungsraum 15 ccm) filtriert und mit dem gleichen Volumen Wasser nachgewaschen. Im Filtrat waren alles Calcium, Magnesium, Eisen und Phosphorsäure gelöst enthalten. Nun wurde mit soviel konzentrierter Ammoniaklösung versetzt, bis die Flüssigkeit stark nach Ammoniak roch und sich ein Niederschlag gebildet hatte, sodann aufgeköcht, worauf Eisen als Phosphat und Hydroxyd, Calcium und Magnesium aber als Phosphat ausfielen; dann wurde so lange am Wasserbad erwärmt, bis der Geruch nach Ammoniak vollkommen verschwand, 5 Tropfen 10%iger Essigsäure hinzugefügt, worauf Calcium und Magnesium vollständig in Lösung gingen, während das Eisen zum großen Teil als Niederschlag zurückblieb. Auch das restliche noch in Lösung befindliche Eisen fiel in Form des basischen essigsauren Salzes aus, als die Flüssigkeit nochmals aufgeköcht ward. Nun wurde die Flüssigkeit, die zu dieser Zeit nur mehr Calcium und Magnesium gelöst enthielt, noch durch 15 Minuten am Wasserbad belassen, durch Watte filtriert, das Filtrat in einer kleinen Kristallisationsschale aufgefangen, mit Wasser nachgewaschen und das Filtrat am Wasserbad eingedampft. Der Trockenrückstand wurde mittels 2 Tropfen 1%iger Essigsäure und 2 ccm Wasser gelöst, durch Watte in eine Zentrifugieröhre filtriert und mit so viel Wasser nachgewaschen, daß die ganze Flüssigkeitsmenge etwa 5 ccm betrug. Die so beschickte Zentrifugieröhre wurde im siedenden Wasserbad erwärmt und das Calcium durch tropfenweises Hinzufügen von 5 Tropfen einer konzentrierten Lösung von oxalsaurem Ammonium gefällt, dabei die Flüssigkeit nach Zusatz jedes Tropfens durcheinandergeschüttelt. Nach  $\frac{1}{2}$ stündigem Stehenlassen wurde zentrifugiert, die über dem Niederschlag befindliche klare Flüssigkeit abgehoben, der Rückstand in der gewohnten Weise mit dreimal 4 ccm Wasser gewaschen mit 2 ccm n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> übergossen und mit n/100 Permanganat aus einer Mikrobürette titriert.

Zur Bestimmung des relativen Volumens der roten Blutkörperchen und des Plasmas habe ich in früheren Versuchen (1 bis 6) durch Oxalatzusatz ungerinnbar gemachtes Blut in die bekannten 50 mm langen *Hedin*schen Hämatokritröhrchen älterer Konstruktion aufgesogen und in eine kleinere Zentrifuge (2000 Umdrehungen) eingesetzt. In den späteren Versuchen (7 bis 11) verwendete ich längere (150 mm), den *Kottmann*schen nachgebildete Röhrchen, verdünnte das Blut durch Nachsaugen einer 2 $\frac{1}{2}$ %igen Bichromatlösung und setzte sie in den eigens hierzu angefertigten Rahmen einer größeren hängenden Zentrifuge (2500 bis 3000 Umdrehungen). Das Zentrifugieren wurde 1 Stunde lang fortgesetzt und die Höhe des Blutkörperchenstandes von 10 zu 10 Minuten abgelesen. In diesen letzteren Versuchen ließ sich der Calciumgehalt der Blutkörperchen wie folgt berechnen.

Ist  $Ca_B$  bzw.  $Ca_P$  der prozentuale Calciumgehalt des Vollblutes bzw. des Plasmas,  $V_P$  das in Prozenten ausgedrückte Volumen des Plasmas, so entfallen auf die in 100 ccm Blut enthaltenen Blutkörperchen

$$Ca_B - \frac{Ca_P \times V_P}{100} \text{ mg Calcium.}$$

Es unterliegt aber keinem Zweifel, daß infolge der Unmöglichkeit, beim Zentrifugieren alles Plasma aus den Zwischenräumen zwischen den roten

Blutkörperchen wegzubekommen, das Volumen der Blutkörperchen größer, das des Plasmas aber kleiner gefunden wird, als der Wirklichkeit entspricht. Dieser Fehler wird ganz oder zum großen Teile ausgemerzt, wenn man die am Hämatokriten erhaltenen Volumina nach *K. Hirota*<sup>1</sup> korrigiert. Die Berechnung erfolgt aus den zehn Ablesungen, die man während des einstündigen Zentrifugierens in Abständen von je 10 Minuten vornimmt, ist aber recht umständlich, und läßt sich, ohne einen größeren Fehler zu begehen, durch eine vom selben Autor angegebene weit einfachere, abgekürzte ersetzen.

Die einfachere Formel lautet:

$$\text{Korrigiertes Blutkörperchenvolumen} = \frac{t_n - t_1}{\frac{t_n}{V_n} - \frac{t_1}{V_1}},$$

wo  $t_n$  = Zeitdauer in Minuten bis zum beendeten Zentrifugieren,

$t_1$  = Zeitdauer in Minuten bis zur ersten Ablesung,

$V_n$  = Blutkörperchenvolumen nach beendetem Zentrifugieren,

$V_1$  = Blutkörperchenvolumen bei der ersten Ablesung.

### B. Besprechungen der Versuchsergebnisse.

Bereits die anfänglichen Versuche (Nr. 1 bis 6, in Tabelle I), die ja infolge des Oxalatzusatzes, des mangelhaften Verschlusses der Röhrchen im Hämatokriten älterer Konstruktion und — hiervon auch abgesehen — infolge der Unmöglichkeit, die gesuchten Volumina genau abzulesen, mit erheblichen Fehlern behaftet waren, ließen erkennen, das die *Calciumkonzentration im Vollblute angenähert halb so groß ist, wie im Plasma desselben Blutes, woraus sich, da ja Blutkörperchen- und Plasmavolumen angenähert gleich groß sind, schließen ließ, daß in den*

Tabelle I.

Versuch Nr.	Korrigiertes Volumen der Blutkörperchen %	Calciumgehalt		
		des Vollblutes mg-%	des Plasma mg-%	der Blutkörperchen, enthalten in 100 cem Blut mg
1	—	4,2	8,1	—
2	—	6,1	9,7	—
3	—	6,2	10,7	—
4	—	4,6	9,8	—
5	—	6,2	11,1	—
6	—	4,4	9,2	—
7	54	6,0	11,9	+ 0,5
8	56 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	7,1	12,0	+ 1,9
9	51	5,0	11,0	- 0,4
10	49	7,2	13,6	+ 0,3
11	49 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	7,9	15,1	+ 0,3

<sup>1</sup> J. of Biophysics 1, 233, 1925.

*Blutkörperchen offenbar kein Calcium enthalten sei.* Dies ging sicher oder zum mindesten mit größter Wahrscheinlichkeit aus späteren Versuchen (Nr. 7 bis 11 in Tabelle I) hervor.

Sieht man von dem offenbar fehlerhaften Versuch 8 ab, so ergibt sich klar, daß die Blutkörperchen kein Calcium oder bloß in solchen geringen Mengen enthalten, die noch in den Bereich der Fehlergrenzen der Calciumbestimmung einerseits und der Bestimmung des Blutkörperchenvolumens andererseits fallen. Allerdings muß diese Mitteilung, da sie sich auf eine verhältnismäßig kleine Anzahl von beweisenden Versuchen stützt, als eine vorläufige bezeichnet werden. Die Bestimmungen werden auch nach anderen Methoden und auch an anderen Blutarten ausgeführt werden müssen.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *Hári* ausgeführt.

---

## Über den Calciumgehalt der roten Blutkörperchen im menschlichen Blute. II.

Von  
**Stefan Schönberger.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 23. Mai 1932.)

Die Angaben über den Calciumgehalt der roten Blutkörperchen waren lange Zeit hindurch recht schwankend und sind es teilweise auch heute noch. *Hamburger*<sup>1</sup> glaubte fest daran, daß die Blutkörperchen Calcium enthalten, und leitete das von manchen Autoren verzeichnete Fehlen des Calciums davon her, daß es beim üblichen Waschen der Blutkörperchen mit physiologischer Kochsalzlösung herausgelöst wird. Auch später gab es eine ganze Anzahl von Mitteilungen, wonach Calcium in nicht zu vernachlässigenden Mengen in den Blutkörperchen enthalten sei. So fanden viele Jahre später *Cowie* und *Calhoun*<sup>2</sup> ansehnliche Mengen in den Blutkörperchen des Menschen und des Rindes, *Jones*<sup>3</sup> in denen von jungen Menschen (*Jones*' Angaben sind aber durchaus unglaubwürdig, denn an sieben Knaben fand er hintereinander 12,1, 12,3, 12,3, 12,3, 12,3, 12,3 12,3 % im Plasma!). Auf Grund anderer verlässlicherer Angaben, besonders aber nach *Kramer* und *Tisdalls*<sup>4</sup> Untersuchungen, scheint diese Frage als dahin erledigt zu sein, daß die roten Blutkörperchen des Menschen *kein* Calcium enthalten. Wenn ich es dennoch unternehmen habe, weitere Versuche an Menschenblut auszuführen, geschah es, teils um den sieben Fällen von *Kramer* und *Tisdall* eine größere Zahl zur Seite zu stellen, teils weil die genannten Autoren den Calciumgehalt

---

<sup>1</sup> Zeitschr. f. physik. Chem. **69**, 669, 1909, zitiert nach Oppenheimers Handb. d. Biochem. 2. Aufl., **2**, 577.

<sup>2</sup> J. of biol. Chem. **37**, 505, 1919.

<sup>3</sup> Ebendasselbst **49**, 187, 1921.

<sup>4</sup> Ebendasselbst **53**, 241, 1922.

der Blutkörperchen aus dem des Vollblutes und des *Blutserums* berechnet haben. Der etwaige Einwand gegen *Kramer* und *Tisdalls* negative Befunde, daß beim Gerinnungsvorgang Stoffe gebildet werden, durch die die Durchgängigkeit der Blutkörperchen erhöht wird, und dementsprechend auch ihre Zusammensetzung eine Änderung erfahren kann, ist zwar gegenstandslos, da man sich ja nicht vorstellen kann, daß infolge des Gerinnungsvorganges Calcium restlos aus den Blutkörperchen austreten bzw. in ein calciumreiches Medium, wie es das Plasma ist, eintreten soll. Da ich jedoch gleichzeitig auch an Hundeblut gearbeitet habe, und es nach Versuchen, die zurzeit noch nicht reif zur Veröffentlichung sind, den Anschein hat, daß Blutkörperchen des Hundes Calcium enthalten können, habe ich die Versuche auch am Menschen ausgeführt, und zwar den Calciumgehalt der roten Blutkörperchen aus dem des Vollblutes und Blutplasmas, nicht des Vollblutes und Blutserums berechnet.

Denselben Zweck dienten auch die von *Gulácsy*<sup>1</sup> ausgeführten Versuche, die aber mit einer anderen Methodik wiederholt werden sollten.

#### Methodik der Versuche.

Erwachsenen Männern von etwa 20 bis 24 Jahren wurden etwa 40 ccm Blut bei der angestauten Vena mediana cubiti entnommen und hiervon je 10 ccm in zwei, je 12 bis 15 ccm fassende, zu einer kleinen Zentrifuge gehörende, mit Paraffin ausgegossene Zentrifugierrohrechen, 15 bis 20 ccm aber in einen größeren, ebenfalls mit Paraffin ausgegossenen Porzellantiegel einfließen gelassen. Die Zentrifugiergläser wurden in je eine größere, etwa 100 ccm fassende, zu einer größeren Zentrifuge gehörende, mit eiskaltem Wasser angefüllte Zentrifugieröhre eingesetzt, die beiden Röhren möglichst rasch gegeneinander austariert, und dann mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 3500 pro Minute, je nachdem, wieviel Zeit von der Blutentnahme an gerechnet verflossen war, 4 bis 8 Minuten lang zentrifugiert. Unterdessen wurden a) einerseits dem Blut im Porzellantiegel zweimal je etwa 5 ccm mittels einer Pipette entnommen und in je einen 50 ccm fassenden, mit Wasser beschickten, vorher und nachher genau gewogenen Meßkolben eingefüllt, b) andererseits zwei 15 cm lange Hämatokritröhren bis zur Marke gefüllt, und 2,5%ige Kaliumbichromatlösung nachgesogen. Nun wurde dem Plasma, das sich inzwischen oberhalb der Blutkörperchensäule in den kleinen Zentrifugieröhren angesammelt hat, soviel wie möglich (in der Regel etwa 2 bis 3 ccm) mittels einer Pipette entnommen, und wie oben in je einen 50 ccm fassenden mit Wasser beschickten, vorher und nachher genau gewogenen Meßkolben entleert. Die Gewichtsbestimmung der zu verarbeitenden Proben zog ich der Volumenbestimmung vor, da man, wenn genau gearbeitet werden soll, die Flüssigkeit aus der Pipette langsam fließen lassen muß, wobei aber die Gefahr der Gerinnung eine große ist. Da jedoch der Calciumgehalt immer in Volumengewichtsprozenten angegeben wird, mußte ich die erhaltenen Gewichte in Volumina umrechnen,

<sup>1</sup> Diese Zeitschr. 251, 162, 1932.

was, ohne einen nennenswerten Fehler zu begehen, stets auf Grundlage des durchschnittlichen spezifischen Gewichtes des Blutes (1060) und des Plasmas (1030) geschah.

Da die Berechnung des Calciumgehaltes der Blutkörperchen einerseits auf den Calciumgehalt des Vollblutes und des Plasmas, andererseits auf das relative Volumen der Blutkörperchen bzw. des Plasmas gegründet ist, muß letzteres möglichst genau bekannt sein. Es wurde erst 10, dann aber weitere 50 Minuten lang zentrifugiert und aus den beiden Ablesungen durch Extrapolation nach der einfacheren der beiden Formeln von *Kozo Hirota*<sup>1</sup> das wirkliche Volumen berechnet, das erst nach unendlich langem Zentrifugieren hätte erlangt werden können. Die Formel lautet:

$$v = \frac{t_2 - t_1}{\frac{t_2}{v_2} - \frac{t_1}{v_1}},$$

wobei mit  $v$  das gesuchte wirkliche Blutkörperchenvolumen, mit  $v_1$  das beim erstenmal abgelesene Blutkörperchenvolumen, mit  $v_2$  das beim zweitenmal abgelesene Blutkörperchenvolumen, mit  $t_1$  die bis zur ersten Ablesung verstrichene Zeit in Minuten, mit  $t_2$  die bis zur zweiten Ablesung verstrichene Zeit in Minuten bezeichnet ist.

Das Calcium im Vollblut und im Plasma wurde nach folgender Methode bestimmt, die in ihren Einzelheiten nur unwesentliche Neuerungen bietet, doch in dieser Zusammenstellung noch nicht verwendet wurde. Die Flüssigkeit in den vier Meßkolben, die die Blut- bzw. die Plasmaproben enthalten, wird zur Enteiweißung mit 10 ccm Trichloressigsäure versetzt und dann, um das Schäumen zu verhindern, ein Tropfen Oktylalkohol zugefügt, mit Wasser auf 50 ccm ergänzt, stark geschüttelt, endlich zentrifugiert. Von der klaren Flüssigkeit werden 30 ccm abpipettiert, in einem etwa 50 ccm fassenden Becherglas bis zur Bräunung eingedampft (läßt man den Rückstand schwarz werden, so ist er im Wasser nicht mehr vollständig löslich). Zum Rückstand werden 2 ccm einer kaltgesättigten Lösung von essigsaurem Natrium und 1 ccm einer kaltgesättigten Lösung von oxalsaurem Ammonium hinzugefügt, das Gemisch wird 1 Stunde lang bei Zimmertemperatur stehengelassen, der Niederschlag von oxalsaurem Calcium auf ein *Schott'sches* Glasfilter Nr. 15 a G 4 (Porenweite kleiner als  $7 \mu$ ) gebracht, das mittels eines Gummistopfens auf die Mündung einer Saugflasche aufgesetzt ist, die Mutterlauge mittels der Wasserstrahlluftpumpe abgesaugt, und der Niederschlag am Glasfilter vier- bis fünfmal mit 2%iger Ammoniaklösung gewaschen. Nun wird das Glasfilter mittels eines Gummistopfens auf die obere Mündung einer Eprovette von 3 cm lichter Weite aufgesetzt, die, wie die Saugflaschen, einen seitlich angeschmolzenen Ansatz trägt. Nachdem dieser Ansatz mit der Wasserstrahlluftpumpe verbunden ist, benetzt man den Niederschlag von oxalsaurem Calcium mit 3 ccm 3%iger Schwefelsäure, läßt 20 Minuten lang stehen, saugt unter möglichst kleinem Druck ab, wäscht dreimal bis viermal mit derselben Menge derselben Schwefelsäure nach, stellt die Röhren in ein Wasserbad, und läßt, sobald der Inhalt erwärmt ist, ein genau abgelesenes Volumen einer n/100 Kaliumpermanganatlösung aus einer Mikrobürette hinzufießen, so zwar, daß das Permanganat

<sup>1</sup> J. of Biophysics 1, 233, 1925.

im Überschuß vorhanden sei. Durch Einsetzen in Eiswasser wird die Flüssigkeit in den Eprouvetten abgekühlt, ein Kriställchen Jodkalium hinzugefügt, und das durch den Permanganatüberschuß in Freiheit gesetzte Jod mittels einer frisch bereiteten n/200 Natriumthiosulfatlösung unter Verwendung einer Stärkelösung als Indikator titriert. Der Titer der verwendeten Lösungen wird vor jedem Versuch mittels einer genau eingestellten n/100 Kaliumbijdatlösung kontrolliert. Die Berechnung des in den Blutkörperchen enthaltenen Calciums geschieht auf Grund folgender Überlegung. Ist  $v_K$  das nach *Hirota* korrigierte Volumen der Blutkörperchen,  $100 - V_K = V_P$  das des Blutplasmas,  $Ca_B$  der Calciumgehalt des Vollblutes,  $Ca_P$  der des Blutplasmas, beides in Milligrammprozent ausgedrückt, so ist die Menge des Calciums, das in Blutkörperchen aus 100 ccm Blut enthalten ist, in Milligramm ausgedrückt, gleich

$$Ca_B - \frac{Ca_P \cdot V_P}{100}.$$

### Die Ergebnisse der Versuche.

Der Calciumgehalt des Vollblutes und des Plasmas, sowie auch der auf obige Weise berechnete Calciumgehalt der Blutkörperchen sind in der Tabelle I enthalten. Um die erhaltenen Daten entsprechend bewerten zu können, habe ich jedesmal beide in den Parallelversuchen am Vollblut und am Plasma erhaltenen Werte in die Tabelle eingetragen und im Tabellenkopf mit a bzw. b bezeichnet. Aus diesen vier Werten ließen sich natürlich vier Werte für das Blutkörperchencalcium errechnen. Von diesen sind nur zwei in die Tabelle eingetragen, und zwar ein maximaler und ein minimaler, im Tabellenkopf mit max. bzw.

Tabelle I.

Versuch	Korrigiertes Blutkörperchen-volumen	Calciumgehalt					
		des Vollblutes mg-%		des Plasmas mg-%		der Blutkörperchen, enthalten in 100 ccm Blut mg	
		a	b	a	b	max.	min.
Nr.	%						
1	42,5	4,06	3,97	6,90	6,70	+ 0,21	± 0
2	43,1	5,99	5,90	10,10	9,95	+ 0,33	+ 0,15
3	39,8	5,46	4,84	8,84	8,72	+ 0,21	- 0,48
4	49,3	4,70	4,61	9,48	9,43	- 0,08	+ 0,20
5	51,0	5,01	4,83	9,10	8,95	+ 0,63	+ 0,38
6	41,8	7,26	7,07	12,48	11,92	+ 0,32	- 0,19
7	49,5	5,23	4,92	10,64	10,12	+ 0,12	- 0,45
8	46,3	7,38	6,60	14,42	14,12	- 0,20	- 1,14
9	55,0	3,83	3,76	8,01	7,10	+ 0,71	+ 0,24
10	48,5	6,55	6,22	11,16	10,62	+ 1,08	+ 0,58
11	54,2	5,62	5,42	12,20	11,92	+ 0,17	- 0,16
12	48,4	5,85	5,72	11,65	11,20	+ 0,08	- 0,19
13	46,9	5,95	5,89	10,69	10,52	+ 0,27	+ 0,12
14	47,2	5,45	5,18	9,63	9,25	+ 0,57	- 0,10

min. bezeichnet. Ersterer ist aus dem größeren Vollblut- und kleineren Plasma-, der zweite aber aus dem kleineren Vollblut- und größeren Plasmawert berechnet.

Wenn man von den beinahe unvermeidlichen und nicht in Rechnung zu stellenden Versuchsfehlern absieht, die man bei dem Einmessen der zu untersuchenden Flüssigkeiten (Blut oder Plasma), beim Fällen des Calciums, beim Lösen des oxalsauren Calciums, bei der Feststellung des Titors der verwendeten Permanganatlösung und Thiosulfatlösung, beim Ablesen des Volumens der zur Oxydation verwendeten Permanganatlösung begeht, so verbleibt eine recht ansehnliche Fehlerquelle bei dem Zurücktitrieren mit der Thiosulfatlösung, welcher Fehler sich den oben erwähnten beigesellt, und ganz beiläufig wie folgt berechnet werden kann. Verarbeitet man, wie ich es tat, etwa 5 ccm Blut mit einem durchschnittlichen Calciumgehalt von 0,005 % bzw. etwa  $2\frac{1}{2}$  ccm Plasma mit dem durchschnittlichen Calciumgehalt von 0,010 %, und verarbeitet dann stets 30 ccm der auf 50 ccm verdünnten Lösung, so hat man es immer mit 0,15 mg Ca zu tun. Schätzt man den beim Titrieren begangenen Fehler auf etwa  $\frac{1}{2}$  Tropfen, gleich 0,025 ccm der n/200 Thiosulfatlösung, so bedeutet dies einen Fehler von 0,0025 mg Ca, d. i.  $\pm 1,6\%$  des Calciums in der zu titrierenden Lösung. Hat man nun zwei Parallelanalysen, so können diese aus diesem Grunde allein um 3,2 % voneinander verschieden sein. Nehmen wir nun weiter an, daß das relative Volumen der Blutkörperchen und des Plasmas je 50 % beträgt, so erhält man für den Calciumgehalt der in 100 ccm Blut enthaltenen Blutkörperchen laut der bei der Methodik erörterten Formel:

	statt mg	entweder mg	oder mg
in 100 ccm Vollblut . . . .	5,0	4,92	5,08
in 50 ccm Plasma . . . .	5,0	5,08	4,92
daher in den Blutkörperchen	0	— 0,16	+ 0,16

Auf diese Weise lassen sich die Minuswerte in meiner Tabelle sowie in der von *Kramer* und *Tisdall* erklären. Andererseits muß wiederholt werden, daß Fehler anderer Art weit größere Unstimmigkeiten zwischen Parallelanalysen hervorrufen können. Dies war in einer ganzen Anzahl meiner Versuche der Fall. In vielen derselben waren die Ergebnisse der Parallelanalysen entweder am Vollblut oder am Plasma, oder an beiden dermaßen voneinander verschieden, daß diese Versuche überhaupt nicht berücksichtigt werden konnten. Recht große Unterschiede finden sich auch in den in die Tabelle aufgenommenen Versuchen, was daraus, was hierüber weiter oben gesagt wurde, verständlich ist. Aber auch so



ist das Endresultat ein eindeutiges. Berechnet man nämlich den Mittelwert aus allen maximalen und minimalen (teilweise positiven, teilweise negativen) Werten, so erhält man für das Calcium in den roten Blutkörperchen aus 100 ccm menschlichem Blute 0,09 mg. Dies würde etwa 2% des gesamten Calciumgehaltes des Blutes ausmachen, ist aber weniger, als den unvermeidlichen Versuchsfehlern entspricht. Daher kann mit Fug und Recht gesagt werden, daß die *Blutkörperchen des erwachsenen Menschen kein Calcium enthalten*, wie dies unter anderem mit großer Wahrscheinlichkeit aus den Versuchen von *Gulácsy* hervorging.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *Hári* ausgeführt.

*Sonderabdruck*  
aus „*Biochemische Zeitschrift*“ **251**, 452, 1932.  
Verlag von *Julius Springer*, Berlin W 9.

# Über die Einheitlichkeit der prosthetischen Gruppe der Hämoglobine verschiedener Herkunft.

Von  
Josef Poldermann.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 7. Juni 1932.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Frage, ob es nur *ein* Hämoglobin gibt oder mehrere Hämoglobine zu unterscheiden sind, hat im Laufe der Zeiten so manche Wandlungen erfahren. Als es gelungen ist, den Farbstoff aus den verschiedensten Blutarten kristallisiert zu erhalten, durfte aus der oft recht verschiedenen Kristallform auf wesentliche Verschiedenheiten geschlossen werden, und man kam hiervon erst ab, als es später in gewissen Fällen gelang, die bis dahin als charakteristisch geltende Kristallform durch Umkristallisieren zu ändern. Als weiterhin nachgewiesen wurde, daß das Hämoglobin welcher Tierart immer unwandelbar 0,34 % Eisen enthält, und daß in jedem kristallisierten Oxyhämoglobin auf 1 Molekül Hämoglobin 1 Molekül Sauerstoff entfällt, war man überzeugt davon, daß man es im Hämoglobin ungeachtet seiner Herkunft stets mit derselben Verbindung zu tun habe.

Dieser Auffassung wurde ein Ende bereitet durch den an einigen Hämoglobinarten sicher geführten Nachweis<sup>1</sup>, daß im Schwefelgehalt sehr bedeutende und charakteristische Unterschiede bestehen können (so z. B. 0,57 % im Rinder-, 0,97 % im Katzenhämoglobin). Da der Schwefel in der Globinkomponente enthalten ist, beruht die Verschiedenheit der Hämoglobine auf Verschiedenheiten der Globine, was auch tatsächlich bewiesen wurde<sup>2</sup>. Dabei könnte aber *die eisenhaltige Komponente stets dieselbe oder* aber ebenfalls *verschieden* sein. Zur Klärung dieses Umstandes wurden die nachfolgend beschriebenen Versuche ausgeführt.

Oxyhäm (Hämatin), die eisenhaltige Komponente des Oxyhämoglobins, ist nicht kristallisierbar, und bietet in der Form des

<sup>1</sup> *Jolan Valer*, diese Zeitschr. 190, 444, 1927; *Elisabet Timár* ebendasselbst 202, 365, 1928.

<sup>2</sup> *Emil Kaiser*, ebendasselbst 192, 58, 1927.

bekanntem amorphen, schwarzen Pulvers keine Gewähr für Reinheit. Wohl ist dies aber der Fall bezüglich des Chlorhämins (des früheren Hämins), das leicht dargestellt und umkristallisiert werden kann, also durchaus zuverlässig ist. Am Chlorhämin erbrachten bisher ausgeführte Untersuchungen weder physikalische, noch aber chemische Unterschiede; dennoch kann es solche geben, und zwar die sich auf die *sterische Konfiguration* beziehen. Es soll nur an die glänzenden Untersuchungen von *Hans Fischer* über die vier isomeren Koproporphyrine erinnert werden, die sich nur in Form ihrer Methylester unterscheiden lassen. Wie bekannt, ist in jedem der vier Pyrrolkerne des Ätioporphyrins, aus dem sich alle Porphyrine, weiterhin auch Oxyhämin, Chlorhämin usw. ableiten lassen, ein Wasserstoff durch eine Methyl-, ein zweiter durch eine Äthylgruppe ersetzt. Isomerien ergeben sich aber dadurch, daß die Reihenfolge der substituierenden Methyl- und Äthylgruppen eine verschiedene sein kann, einmal z. B. so, daß in dem durch die vier Pyrrole gebildeten Viererring die Methyl- und Äthylgruppen einander stets wechselnd folgen, ein anderes Mal aber so, daß an *einer* Stelle der Methyl-Äthyl-Konfiguration die Äthyl-Methyl-Konfiguration folgt. Da sich das Chlorhämin (vom eingeführten Eisen abgesehen) vom Ätioporphyrin durch Ersatz von zwei Äthylgruppen durch zwei Vinylgruppen, von anderen zwei Äthylgruppen durch zwei Propionsäurereste ableiten läßt, sind den obigen ähnliche Isomerien auch bezüglich des Chlorhämins denkbar; nur ist die Frage, wie diese nachgewiesen werden könnten.

Von physikalischen Methoden hielt ich die Prüfung der Lichtabsorption am geeignetsten; doch nicht die einfache Spektrometrie, die sich auf Lagebestimmung der Absorptionsstreifen beschränkt, sondern die spektrophotometrische Bestimmung der Lichtabsorption längs einer möglichst langen Strecke des sichtbaren Spektrums. Denn auf diese Weise können sich charakteristische Unterschiede auch in dem Falle ergeben, wenn die Spektrometrie ein zweifelhaftes oder durchaus negatives Ergebnis liefert. Es soll diesbezüglich bloß an das Oxy- und Kohlenoxydhämoglobin erinnert werden, die sich spektrometrisch nur in einer ganz geringen Verschiebung ihrer beiden Absorptionsstreifen unterscheiden, während die Extinktionskoeffizienten an den beiden von *Hüfner* seinerzeit vorgeschlagenen Stellen des Spektrums (565 bis 554 und 542,5 bis 531,5  $\mu\mu$ ) derart verschieden sind, daß ihr Quotient am Oxyhämoglobin 1,58, am Kohlenoxydhämoglobin aber 1,10 beträgt.

#### Methodik der Versuche.

Da es in diesen Versuchen auch auf allergeringste Unterschiede ankam, und es immerhin möglich ist, daß kleine Abweichungen bei der Darstellung des Chlorhämins zu solchen Unterschieden führen, habe ich streng darauf geachtet, daß Temperatur, Dauer des Erhitzens, Konzentration der ver-

wendeten Reagenzien stets dieselben seien. Kristallisiertes Chlorhämין wurde nach dem bekannten Verfahren wie folgt dargestellt. Mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschene Blutkörperchen wurden durch Zusatz von je  $\frac{1}{2}$  Volumen Wasser und Äther hämolysiert, die Hämoglobinlösung nach dem Verjagen des Äthers (durch einen Luftstrom) in das dreifache Volumen von schwach siedendem mit 4,5 g Kochsalz pro Liter versetzten Eisessig Tropfen für Tropfen einlaufen gelassen, noch 10 Minuten lang im Sieden erhalten, dann abgekühlt, 24 Stunden lang im Eisschrank belassen, der Kristallbrei nach Dekantieren der darüber befindlichen Flüssigkeit am Filter erst mit verdünnter Essigsäure, dann mit Wasser gewaschen, getrocknet und nach *Küster*<sup>1</sup> umkristallisiert. Zu diesem Behufe wurde das Chlorhämין in einem Pyridinchloroformgemisch (3 ccm Pyridin und 10 ccm Chloroform pro 1 g Chlorhämין) gelöst und in schwach siedenden, wie oben mit Kochsalz versetzten Eisessig (140 ccm pro 1 g Chlorhämין), dem unmittelbar vorher 0,5 ccm konzentrierte Salzsäure hinzugefügt wurde, tropfenweise einlaufen gelassen, noch 10 Minuten lang im Sieden erhalten und weiter wie oben behandelt. Das Trocknen erfolgte in einem mit Schwefelsäure und festem Ätzkali beschicktem Exsikkator.

Die spektrophotometrischen Bestimmungen wurden mittels eines seit Jahren im Institut benutzten, nach *Martens* und *Grünbaum* modifizierten, *Königschen* Apparats ausgeführt, der vor etwa 2 Jahren in derselben Werkstätte neu justiert wurde, in der der Apparat ursprünglich angefertigt war. Die Kalibrierung erfolgte nach dem Vorgang von *G. Neumann*<sup>2</sup>. Der Objektivspalt wurde 0,1 mm breit genommen; der von dem (nicht meßbar verstellbaren) Okularspalt eingeschlossene Spektralausschnitt hatte in Rot eine Breite von 15  $\mu\mu$ , in Blau eine solche von 5  $\mu\mu$ . Als Lichtquelle diente eine starke Metallfadenglühlampe in Milchglasgehäuse. Das Chlorhämין wurde in 1%iger Lauge gelöst der Untersuchung zugeführt und die Konzentration der Lösung so gewählt, daß an den verschiedenen Spektralbereichen trotz verschiedener Lichtabsorption weder die Konzentration noch aber die Schichtdicke (10 mm) geändert werden mußte. Hierzu geeignet wurden Lösungen befunden, die 0,018 bis 0,020 g in 100 ccm enthielten. Die Ablesungen wurden in drei Etappen durchgeführt: zunächst in großen Intervallen längst des größten Teiles des sichtbaren Spektrums, dann in weit engeren Intervallen um das Maximum und Minimum der Lichtabsorption herum.

### Die Ergebnisse der Versuche.

Die Extinktionskoeffizienten wurden in sämtlichen Versuchsreihen, um verglichen werden zu können, auf 0,10 % Konzentration der Lösung bezogen, also in sogenannte spezifische Extinktionskoeffizienten umgerechnet. Ehe ich an die Besprechung der in den Tabellen I und II zusammengestellten Daten gehe, soll auf einen Umstand aufmerksam gemacht werden, der mir zunächst nicht bekannt sein konnte und in den zu allererst ausgeführten Versuchsreihen zu einigen Unstimmigkeiten führte. Die Lichtabsorption des in Lauge gelösten Chlorhämins

<sup>1</sup> Zitiert nach *Hoppe-Seyler-Thierfelders* Handb. d. physiol. u. pathol.-chemischen Analyse, 9. Aufl., S. 402, 1924.

<sup>2</sup> Diese Zeitschr. 248, 208, 1932.

Tabelle

Mitte des Spektral-ausschnittes $\mu\mu$	Spezifische Extinktionskoeffizienten des Chlorhämins von																		
	Pferd			Schwein			Hund			Katze			Mensch						
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	
	längs des ganzen Spektrums																		
636,4	4,07	4,20	4,10	4,13	4,23	4,20	4,21	4,16	4,12	—	4,26	4,16	3,86	4,08	4,08	4,08	4,06	4,17	—
625,5	5,90	6,00	5,89	5,87	6,02	5,96	6,03	5,93	5,86	—	6,00	5,94	5,66	5,79	5,80	5,80	5,77	5,87	—
610,3	7,00	7,03	6,96	6,99	7,05	7,02	7,14	6,95	7,04	—	6,86	6,88	6,79	6,84	6,90	6,85	6,81	6,93	—
605,5	6,95	6,99	6,95	6,99	7,01	6,96	7,06	6,86	6,74	—	6,83	6,87	6,87	6,84	6,80	6,80	6,76	6,85	—
594,9	6,59	6,58	6,53	6,61	6,52	6,48	6,61	6,43	6,32	—	6,31	6,43	6,35	6,36	6,30	6,30	6,26	6,42	—
587,6	6,23	6,42	6,28	6,36	6,25	6,08	6,26	6,17	6,02	—	6,13	6,16	6,11	6,09	6,01	6,01	5,97	6,15	—
579,9	6,13	6,22	6,14	6,19	6,07	5,94	6,16	5,99	5,85	—	5,87	5,98	5,98	5,99	5,82	5,82	5,67	5,96	—
569,9	6,48	—	—	6,05	5,94	5,85	5,96	5,83	5,70	—	5,75	5,84	5,61	5,92	5,70	5,70	5,67	5,84	—
556,9	6,47	6,18	6,12	6,13	6,09	6,01	6,18	5,94	5,82	—	5,95	5,94	—	6,17	5,85	5,85	5,82	5,97	—
537,3	7,05	7,24	7,28	7,21	7,34	7,33	7,45	7,26	7,07	—	7,39	7,26	7,08	7,30	7,23	7,18	7,18	—	—
521,8	7,84	8,13	8,03	8,08	8,25	8,23	—	—	7,99	—	7,96	—	7,85	—	8,09	8,04	—	—	—
Dasselbe um das Absorptionsmaximum herum.																			
614,8	—	6,80	6,71	6,86	6,88	7,04	6,77	6,77	6,74	6,88	6,75	6,83	6,81	6,72	6,82	6,82	6,86	6,85	—
612,1	—	6,91	6,79	6,88	6,95	7,11	6,84	6,87	6,78	6,92	6,81	6,90	6,88	6,84	6,90	6,90	6,89	6,99	—
610,3	—	6,95	6,98	6,94	7,02	7,16	6,87	6,92	6,88	7,00	6,85	6,97	6,93	6,84	6,96	6,96	6,92	6,96	—
608,5	—	6,89	6,95	6,96	6,97	7,12	6,87	6,97	6,87	6,97	6,96	6,96	6,91	6,89	6,96	6,91	6,91	6,95	—
606,7	—	6,86	6,92	6,95	6,87	7,09	6,84	6,87	6,84	7,00	6,90	6,88	6,91	6,86	6,88	6,84	6,84	6,90	—
605,5	—	6,84	6,92	6,86	6,86	7,02	6,81	6,84	6,84	6,96	6,86	6,85	6,83	6,84	6,86	6,80	6,80	6,89	—
604,2	—	6,79	6,83	6,73	6,80	6,89	6,74	6,80	6,75	6,84	6,82	6,76	6,79	6,84	6,76	6,71	6,81	6,81	—
602,5	—	6,72	6,82	6,74	6,74	6,85	6,68	6,77	6,73	6,78	6,69	6,65	6,74	6,82	6,70	6,70	6,70	6,77	—
Dasselbe um das Absorptionsminimum herum.																			
581,0	5,93	—	6,04	6,09	5,91	5,93	6,03	6,00	6,02	5,92	5,99	5,81	6,07	6,00	5,97	5,85	5,85	5,97	5,97
579,7	5,91	—	6,01	6,04	5,87	5,89	6,01	5,94	6,02	5,89	5,94	5,80	6,04	5,99	5,93	5,84	5,84	5,96	5,93
577,6	5,89	—	5,97	6,02	5,85	5,86	5,93	5,91	5,92	5,85	5,90	5,75	6,01	5,95	5,86	5,83	5,83	5,93	5,86
575,5	5,83	—	5,92	5,97	5,80	5,85	5,91	5,88	5,91	5,85	5,89	5,72	5,97	5,84	5,84	5,72	5,89	5,83	5,83
573,4	5,87	—	5,88	5,89	5,76	5,80	5,85	5,84	5,86	5,80	5,82	5,71	5,97	5,85	5,79	5,68	5,88	5,89	5,83
571,3	5,82	—	5,87	5,93	5,78	5,79	5,83	5,79	5,99	5,79	5,79	5,65	5,88	5,81	5,76	5,73	5,81	5,74	5,74
569,2	5,84	—	5,83	5,78	5,79	5,77	5,82	5,80	5,97	5,78	5,80	5,64	5,84	5,82	5,75	5,65	5,84	5,74	5,74
567,1	5,76	—	5,82	5,83	5,72	5,75	5,85	5,80	5,94	5,75	5,78	5,58	5,85	5,87	5,74	5,69	5,87	5,74	5,74
565,0	5,77	—	5,83	5,79	5,72	5,72	5,85	5,80	5,94	5,73	5,77	5,68	5,82	5,86	5,72	5,92	5,85	5,75	5,75
562,9	5,84	—	5,85	5,90	5,76	5,87	—	—	—	5,77	5,82	5,71	5,87	5,85	5,74	5,94	5,86	5,77	5,77

Tabelle II.

Mitte des Spektralausschnittes $\mu\mu$	Mittelwerte der spezifischen Extinktionskoeffizienten des Chlorhämins von						Gesamt- mittel
	Pferd	Rind	Schwein	Hund	Katze	Mensch	
	längs des ganzen Spektrums						
636,4	4,12	4,19	4,16	4,21	3,97	4,10	4,12
625,5	5,93	5,95	5,94	5,97	5,73	5,81	5,89
610,3	7,00	7,02	7,04	6,87	6,82	6,86	6,93
605,5	6,96	6,99	6,89	6,85	6,86	6,81	6,89
594,9	6,57	6,54	6,45	6,37	6,36	6,33	6,44
587,6	6,31	6,23	6,15	6,15	6,10	6,04	6,16
579,9	6,16	6,07	6,00	5,93	5,99	5,86	6,00
569,9	6,48 (?)	5,95	5,83	5,80	5,72	5,74	5,92
556,9	6,26	6,08	5,98	5,95	6,17	5,88	6,05
537,3	7,19	7,29	7,26	7,33	7,19	7,21	7,24
521,8	8,00	8,19	7,99	7,96	7,85	8,07	8,01
Dasselbe um das Absorptionsmaximum herum.							
614,8	6,76	6,93	6,76	6,82	6,77	6,84	6,81
612,1	6,85	6,98	6,83	6,88	6,86	6,93	6,89
610,3	6,97	7,04	6,89	6,94	6,89	6,95	6,95
608,5	6,92	7,02	6,88	6,96	6,90	6,94	6,94
606,7	6,89	6,97	6,85	6,93	6,89	6,87	6,90
605,5	6,88	6,91	6,83	6,89	6,84	6,85	6,87
604,2	6,81	6,81	6,76	6,81	6,82	6,76	6,79
602,5	6,77	6,78	6,73	6,71	6,78	6,72	6,75
Dasselbe um das Absorptionsminimum herum.							
581,0	5,99	5,98	6,02	5,91	6,04	5,94	5,98
579,7	5,96	5,93	5,99	5,88	6,02	5,92	5,95
577,6	5,93	5,91	5,92	5,83	5,98	5,87	5,91
575,5	5,88	5,87	5,90	5,82	5,91	5,82	5,87
573,4	5,88	5,82	5,86	5,78	5,91	5,79	5,84
571,3	5,85	5,83	5,87	5,74	5,85	5,76	5,82
569,2	5,84	5,78	5,86	5,74	5,83	5,75	5,80
567,1	5,79	5,77	5,86	5,70	5,86	5,76	5,79
565,0	5,80	5,74	—	5,73	5,84	5,81	5,78
562,9	5,85	5,84	—	5,77	5,86	5,83	5,83

hat nämlich ein Maximum bei etwa 609 und ein Minimum bei etwa 566  $\mu\mu$ . Läßt man eine solche alkalische Lösung stehen, so wird man bei wiederholten Ablesungen in der Gegend des Maximums auch nach mehreren Tagen stets denselben Wert erhalten, während die Lichtabsorption in der Gegend des Minimums und rotwärts davon schon innerhalb 6 Stunden bedeutend zunimmt, wie dies aus den Extinktionskoeffizienten in nachfolgender Zusammenstellung ersichtlich ist.

	Bei 605,5 $\mu\mu$		Bei 579,7 $\mu\mu$
Sofort abgelesen . . . .	1,36	Sofort abgelesen . . . .	1,12
Nach 2 Stunden abgelesen	1,36	Nach $\frac{1}{2}$ Stunde abgelesen	1,13
„ 2 Tagen „	1,36	„ 6 Stunden „	1,16
„ 7 „ „	1,36	„ 24 „ „	1,19
		„ 14 Tagen „	1,27

Ich habe daher in allen späteren Versuchsreihen die Ablesungen unmittelbar nach erfolgter Lösung in der Gegend des Minimums begonnen, und die in der Gegend des Maximums zu allerletzt gelassen.

Sieht man von diesen vereinzelt Unstimmigkeiten ab, so zeigten die Chlorhämipräparate, die aus dem Blute verschiedener Individuen derselben Tierart gewonnen wurden, weder in der Lage der maximalen, bei  $609 \mu\mu$  gelegenen, und in der der minimalen, bei  $566 \mu\mu$  gelegenen Lichtabsorption, noch aber in deren Größe Unterschiede, die größer gewesen wären, als den zulässigen Versuchsfehlern entspricht. Dasselbe war aber auch bezüglich der Chlorhämine aus verschiedenen Blutarten der Fall, wie dies aus den Daten der Tabelle II ersichtlich ist, in der für je eine Blutart der Mittelwert berechnet ist. Diese Mittelwerte sind in Abb. 1 zur Absorptionskurve des Chlorhämins vereinigt, indem die spezifischen Extinktionskoeffizienten als Ordinaten in ein Koordinatensystem eingetragen wurden, auf dessen Abszissenachse die Wellenlängen verzeichnet sind.

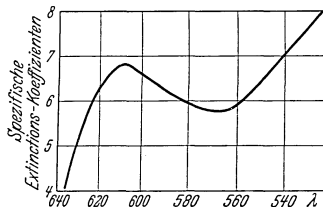


Abb. 1.

Es läßt sich mithin sagen, daß die spektrophotometrische Prüfung der verschiedenen Chlorhämine keinen Anhaltspunkt dafür geliefert hat, daß die prosthetische Gruppe der verschiedenen Hämoglobine eine verschiedene sei, aber auch dafür nicht, daß solche Unterschiede ausgeschlossen seien. Denn vor einiger Zeit wurde von Leikola<sup>1</sup> in diesem Institut gezeigt, daß das aus Chlorhäm in verschiedenen Ursprungs dargestellte Hämatoporphyrin nicht immer dieselbe Lichtabsorption aufweist; in verdünnter Lauge gelöste Präparate vom Pferd und vom Rinde verhalten sich gleich, doch abweichend von Schweinehämatoporphyrin. Allerdings klingt es einigermaßen überraschend, daß die Chlorhämine gleich seien, die aus ihnen abgespalteten Hämatoporphyrine aber Unterschiede aufweisen sollen; immerhin läßt sich aber derlei als möglich vorstellen.

Diese Versuche wurden auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. Hári ausgeführt.

<sup>1</sup> Diese Zeitschr. 223, 436, 1930.





*Sonderabdruck*  
aus „*Biochemische Zeitschrift*“ 252, 212, 1932.  
Verlag von *Julius Springer*, Berlin W 9.

# Über die Darstellung von kristallisiertem Hämoglobin aus Menschenblut.

Von  
Zoltán Aszódi.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der königl.-ungarischen  
Universität Budapest.)

(Eingegangen am 23. Juni 1932.)

Mit 1 Abbildung im Text.

*Haurowitz* ist wohl der erste, dem es gelungen ist, Hämoglobin aus Menschenblut in analysierbaren Mengen darzustellen; allerdings blieb seine Ausbeute unter 0,5 g pro 100 ccm Blut. Durch Änderung der *Haurowitz*schen<sup>1</sup> Methode bzw. des auch von *Haurowitz* benutzten *Heidelberger*schen<sup>2</sup> Vorganges beim Hämolysieren des Blutes gelang es mir, die Ausbeute wesentlich zu steigern, so, daß ich aus 100 ccm Blut, die den meisten Menschen ohne weiteres entnommen werden können, mit Leichtigkeit durchschnittlich über 2 g, in einzelnen Fällen sogar über 4 g umkristallisiertes Hämoglobin erhalten konnte. In nachstehender Beschreibung ist überall in Klammern angegeben, worin sich mein Vorgang von dem *Haurowitz*schen bzw. *Heidelberger*schen unterscheidet.

Rote Blutkörperchen aus defibriniertem Blut (*Heidelberger* verwendet Citratblut) werden auf der Zentrifuge mit 1%iger NaCl-Lösung viermal gewaschen, mit  $\frac{1}{10}$  Volumen destilliertem Wasser versetzt, auf einige Grade oberhalb 0 gekühlt; durch eine dünne Röhre wird Sauerstoff (*Heidelberger* verwendet ein Gemisch aus vier Teilen CO<sub>2</sub> und ein Teil O<sub>2</sub>) durchgeleitet,  $\frac{1}{7}$  Volumen Toluol hinzugefügt und unter ständiger Durchleitung von Sauerstoff solange gerührt, bis das Blut eine pastöse Konsistenz annimmt. Nun wird das Glasgefäß geschlossen, 10 bis 15 Stunden lang im Eisschrank aufbewahrt, dann 4 Stunden lang geschüttelt und im Scheidetrichter 1 Stunde lang im Eisschrank belassen. Während dieser Zeit geht die Scheidung der Stromata von der Hämoglobinlösung vor sich. Letztere wird abgelassen und mit der Lösung vereinigt, die sich aus der die Stromata enthaltenden oberen Schicht durch wiederholtes Zentrifugieren noch gewinnen

<sup>1</sup> Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiolog. Chemie 186, 141, 1930.

<sup>2</sup> Journal of biolog. chemistry 53, 31, 1922.

läßt. Die vereinigten Lösungen werden dreimal durch jedesmal gewechselte, angefeuchtete Watte filtriert und so von den letzten Stromaresten befreit, in Dialysierhülsen (*Schleicher* und *Schüll* Nr. 579) überführt und zunächst 4 bis 5 Tage lang gegen fließendes Wasser, sodann über Nacht gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die auf diese Weise salzfrei gewordene Lösung wird in Zentrifugierröhren von etwa 100 ccm Fassungsraum eingebracht und in einem Gefriergemisch stark unter den Gefrierpunkt des Wassers gekühlt. Sobald auf der Oberfläche der Lösung wie auch an den Wandungen des Glases Eisbildung eintritt, wird rasch abzentrifugiert,

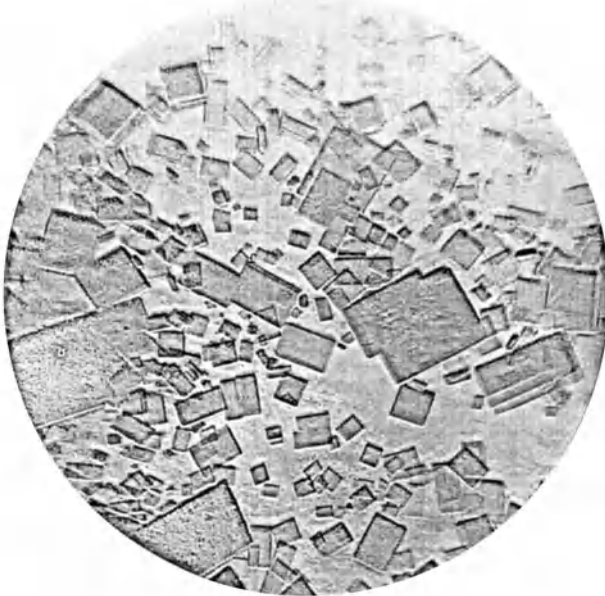


Abb. 1.

das zusammengeballte, auch Hämoglobin enthaltende Eis herausgeholt, die Lösung weiter gekühlt, das gebildete Eis nach dem Zentrifugieren wieder herausgeholt usw., bis etwa die Hälfte der ursprünglichen Flüssigkeit in Form von Eis entfernt ist. Die Flüssigkeit, aus der sich zu dieser Zeit bereits Kristalle in solcher Zahl ausgeschieden haben, daß sie den Boden der Zentrifugierröhre bedecken, wird ebenso wie das inzwischen auftauen gelassene, aber gesondert behandelte hämoglobinhaltige Eis stark abgekühlt, mit  $\frac{1}{4}$  Volumen vorher stark gekühlten Alkohols versetzt (*Hawrowitz* und *Heidelberger* verwenden keinen Alkohol), worauf die Bildung massenhafter Kristalle in der angereicherten Lösung beinahe sofort, in der durch Auftauen gewonnenen aber nach einigen Stunden einsetzt und im Kältegemisch binnen 10 bis 15 Stunden vollendet ist. Jeder Versuch, die Kristalle auf dem Filter durch Waschen rein zu bekommen, wie dies bei der Darstellung des Oxyhämoglobins aus anderen Blutarten üblich ist, mißlingt, da die Kristalle alsbald in Lösung gehen. Man muß sich darauf beschränken, die Kristalle durch scharfes Zentrifugieren von der Mutter-

lauge zu trennen, und wiederholt umzukristallisieren, indem man ihre möglichst konzentrierte stark gekühlte Lösung unter ständigem Umrühren mit dem halben Volumen gekühlten 25%igen Alkohols versetzt und im Eisgemisch stehenläßt. Zum Schluß wird die nach Abgießen der Mutterlauge verbliebene Kristallmasse wiederholt mit ein wenig eiskaltem Wasser verrührt und zentrifugiert.

Am mikroskopischen Präparat (s. auch Abb. 1) der auf diese Weise erhaltenen Kristallmasse sind größere viereckige Platten, selten auch feinere Nadeln zu sehen. Die Kristalle sind, wie erwähnt, sehr leicht in Wasser löslich und bieten so manche Eigentümlichkeiten. Frisch bereitet und noch in der eiskalten Mutterlauge suspendiert, fallen sie durch ihre blaurote Farbe auf; läßt man einen Tropfen der die Kristalle enthaltenden Flüssigkeit längs der Wandung der Zentrifugieröhre in dünner Schicht herunterfließen, so sieht man im rasch angesetzten Spektroskop das *charakteristische einbandige Spektrum des reduzierten Hämoglobins*. Daß es sich um solches handelt, geht daraus hervor, daß der Kristallbrei in Wasser gelöst beinahe unmittelbar nachher bereits das typische zweibandige Absorptionsspektrum des Oxyhämoglobins aufweist. Nicht genug aber, daß das reduzierte Hämoglobin sich aus Menschenblut so ohne weiteres darstellen läßt, während solches aus anderen Blutarten bisher nur unter ganz besonderen Bedingungen kristallisiert erhalten werden konnte. Noch auffallender ist, daß umgekehrt das reduzierte *Hämoglobin des Menschenblutes, in Oxyhämoglobin verwandelt, sich nicht kristallisieren läßt*, wo doch aus den meisten anderen Blutarten kristallisiertes Oxyhämoglobin verhältnismäßig leicht erhalten werden kann.

## Über den Schwefelgehalt des Hämoglobins des Menschen.

Von  
Zoltán Aszódi.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der königl.-ungar. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 25. Juni 1932.)

Von Valér<sup>1</sup> und von Timár<sup>2</sup> in diesem Institut ausgeführte Bestimmungen haben sehr wesentliche und teilweise auch charakteristische Unterschiede im Schwefelgehalt der Hämoglobine verschiedenen Ursprungs ergeben (z. B. 0,57% im Rinder- und 0,97% im Katzenhämoglobin), woraus sich auch ein verschiedenes Verhältnis zwischen Eisen- und Schwefelgehalt berechnen ließ (z. B. Fe : S<sub>3</sub> im Rinder-, Fe : S<sub>5</sub> im Katzenhämoglobin). Nachdem es laut meiner vorangehenden Mitteilung<sup>3</sup> mit Leichtigkeit gelang, aus dem Blute einer ganzen Anzahl von Menschen zur Analyse hinreichende Mengen Hämoglobin zu erhalten, mußte es von Interesse sein, den Schwefelgehalt des menschlichen Hämoglobins kennenzulernen; denn hierüber ist meines Wissens nur eine Angabe, die von Haurowitz<sup>4</sup>, bekannt, der in zwei Präparaten 0,44% gefunden hat.

Die von Valér und von Timár benutzte Methode war die *ter Meulensche*, die sich in ihren Händen, sowie später mir<sup>5</sup> sehr gut bewährte und aus dem Grunde sehr empfehlenswert ist, weil sie auch in Substanzen von so geringem Schwefelgehalt, wie es das Hämoglobin ist, nicht mehr als etwa 0,25 g zur Analyse erheischt. Den Bestimmungen an meinen Hämoglobinpräparaten ließ ich natürlich Probebestimmungen an Cystin in der Weise vorangehen, wie dies von Valér mitgeteilt ist, und erhielt im Durchschnitt von sieben Versuchen 26,9% Schwefel.

---

<sup>1</sup> Diese Zeitschr. **190**, 444, 1927.

<sup>2</sup> Ebenda **202**, 365, 1928.

<sup>3</sup> Ebenda **252**, 212, 1932.

<sup>4</sup> Zeitschr. f. phys. Chem. **136**, 141, 1930.

<sup>5</sup> Z. Aszódi, diese Zeitschr. **212**, 102, 158, 1929.

Da sich aus der Berechnung 26,7% ergibt, ist dieses Analysenergebnis als ein gutes zu bezeichnen.

Um so weniger erfreulich waren meine nach dieser Methode an Menschenhämoglobin erhaltenen Ergebnisse, indem weder die an *einem* Präparat ausgeführten Parallelanalysen, noch aber die an verschiedenen Präparaten ausgeführten Bestimmungen übereinstimmende Werte lieferten. Die Ursache dieser Unstimmigkeiten, die weder bei *Valér* und bei *Tímár* im Jahre 1927 bzw. 1928, noch aber bei mir im Jahre 1929 vorkamen, ist mir bis auf den heutigen Tag unbekannt geblieben. (Es ist möglich, daß die bei der Erzeugung des Wasserstoffs, in dem die Substanz gegläht werden muß, verwendeten Reagenzien, wie Salzsäure und Zink, zur Zeit als wir sie neuerdings bezogen, gewisse Verunreinigungen enthielten, durch die das auf Asbest feinverteilte Platin, das als Katalysator dient, geschädigt wurde.) Ich mußte mich also notgedrungen nach einer anderen Methode umsehen, und ließ in zwei bestbekanntesten Laboratorien (die eine im Reiche, die andere in Österreich) Bestimmungen nach *Carius* ausführen, die aber ein recht klägliches Resultat gaben: An einem Präparat wurde vom selben Analytiker 0,68, 0,85, 0,73, 0,62% erhalten, an einem anderen Präparat vom *einen* 1,20, 1,35%, vom *anderen* 1,07, 1,11%.

Eine andere Methode ist die von *Neumann* und *Meinertz*<sup>1</sup>. Nachdem es mir gelungen ist, ihr eine Form zu geben, in der sie zu Schwefelbestimmungen in Hämoglobin geeignet ist, habe ich alle meine Präparate nach dieser Methode untersucht.

Etwa 0,6 bis 1,2 g des fein pulverisierten, bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Hämoglobins werden in einem 6 $\frac{1}{2}$  cm hohen, oben 6 cm weiten und etwa 150 ccm fassenden Nickeltiegel mit 5 g Kaliumnatriumcarbonat und 2 $\frac{1}{2}$  g Natriumperoxyd vermischt und bei aufgelegtem Tiegeldeckel mittels einer kleinen Gasflamme (sonst Verpuffung und Substanzverlust!) 1 Stunde lang erhitzt, dann abkühlen gelassen, die zusammengesinterte Substanz mit 2 $\frac{1}{2}$  g Natriumperoxyd versetzt, mittels einer kleinen Flamme eine weitere Stunde erhitzt, die nunmehr zum größten Teil verflüssigte Substanz nach dem Abkühlen noch einmal mit 2 g Natriumperoxyd versetzt und  $\frac{1}{4}$  Stunde lang unter ständiger Vergrößerung der Flamme erhitzt, worauf vollständige Verflüssigung eintritt. Es soll nicht länger erhitzt werden, als bis die rotglühende Masse eben homogen geworden ist, da sich sonst allzuviel Nickeloxyd bildet und sehr viel Salzsäure verwendet werden muß, um es in Lösung zu bringen. Die Schmelze wird nach dem Abkühlen in 40 ccm Wasser unter Erwärmen mittels einer kleinen Flamme gelöst, wozu in der Regel  $\frac{1}{4}$  Stunde nötig ist. Die Flüssigkeit, die Nickeloxyd suspendiert enthält, wird in ein 300 ccm fassendes Becherglas überführt, der Tiegel mit etwa 60 ccm Wasser nachgewaschen, aus einer Bürette vorsichtig (starkes Aufschäumen!) bromhaltige konzentrierte Salzsäure hinzufließen gelassen, bis die Flüssigkeit gegen Lackmus

<sup>1</sup> Zeitschr. f. phys. Chem. **43**, 37, 1904.

sauer reagiert. In der Regel werden etwa 22 bis 23 cem Salzsäure verbraucht. Am Wasserbad belassen, geht das Nickeloxyd auf diese Weise (manchmal allerdings erst nach einem weiteren Säurezusatz) in Lösung, und man erhält eine schön blaugrün gefärbte Flüssigkeit, in der die rostbraunen Flocken von Eisenhydroxyd suspendiert sind. Im ursprünglichen *Neumann* und *Meinertzschen* Verfahren ist das Vorhandensein dieses Eisenniederschlages nicht vorgesehen; er wird durch Zusatz einiger Kristalle von salzsaurem Hydroxylamin in Lösung gebracht. Die nunmehr ganz klare grüne Lösung wird auf 250 cem verdünnt, einige Stunden hindurch im Wasserbad gelassen, mit einer 1%igen heißen Lösung von Bariumchlorid solange versetzt, bis kein weiterer Niederschlag von schwefelsaurem Baryt mehr entsteht, dann unter mehrmaligem Ersatz des verdampften Wassers 24 Stunden lang im Wasserbad belassen, endlich der Niederschlag von schwefelsaurem Baryt am Filter gesammelt, gewaschen, verascht und gewogen.

Um mich von der Zuverlässigkeit des Verfahrens zu überzeugen, habe ich zunächst Bestimmungen in  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösungen von bekannter Konzentration ausgeführt und gute Resultate erhalten. Sodann führte ich Bestimmungen an kristallisiertem Rinder- und Katzenoxyhämoglobin aus, deren Schwefelgehalt von *Valér* und von *Timár* zu 0,58 bzw. 0,97 % gefunden wurde. Die Mittelwerte meiner Bestimmungen ergaben in vorzüglicher Übereinstimmung 0,57 und 0,57 % bzw. 0,97 und 0,98 %.

In nachstehender Tabelle habe ich die Ergebnisse der an Menschenhämoglobin in den Jahren 1930 bis 1931 ausgeführten Schwefelbestimmungen zusammengestellt, wobei zu bemerken ist, daß Präparat 1 bis 26 einmal, Präparat 27 bis 32 zweimal umkristallisiert wurden. Das Blut verdanke ich der Liebenswürdigkeit der Vorstände verschiedener medizinischer Kliniken und Abteilungen, wofür ihnen auch an dieser Stelle bestens gedankt sei. Von einer bevorstehenden Blutentnahme wurde ich jedesmal verständigt; und die Venaesektion wurde erst vorgenommen, als ein Bediensteter unseres Instituts dort eintraf und die Defibrinierung an Ort und Stelle vornehmen konnte. In einzelnen Fällen wurde *einem* Menschen in größeren Zeiträumen zwei bis mehrere Male Blut entnommen, und aus diesem jedesmal auch Hämoglobin bereitet; diese von einer Person herrührenden Hämoglobinpräparate wurden jedes für sich analysiert. Mit a) und b) werden die von *einer* Blutprobe herrührenden zwei Präparate bezeichnet, deren eines aus der angereicherten Hämoglobinlösung, das andere aber aus dem aufgetauten hämoglobinhaltigen Eis (siehe meine vorangehende Mitteilung) bereitet wurde.

Es handelt sich insgesamt um 37 Präparate. Hiervon lieferten 22, also etwa zwei Drittel, Werte, die in recht engen Grenzen, und zwar zwischen 0,64 und 0,66 % schwanken; während in 7 Fällen Werte bis hinauf zu 0,69 % und in 8 Fällen bis herunter zu 0,58 % gefunden



Präparat Nr.	Versuchsperson	Klinische Diagnose	Datum der Blutentnahme	Schwefelgehalt	
				Einzelanalysen o/10	Mittelwert o/10
1	Barsi . . . . .	Arteriosclerosis	5. VI. 1930	0,65 0,67	0,66
2	Frau Peter . . . . .	"	24. VI. 1930	0,64 0,64	0,64
3	" . . . . .	"	15. V. 1931	0,68	0,68
4	Fórczac . . . . .	Hypertonia	28. VI. 1930	0,68, 0,68, 0,62, 0,62	0,65
5	" . . . . .	"	11. VIII. 1930	0,68, 0,66, 0,69, 0,66	0,67
6	" . . . . .	"	11. X. 1930	0,64	0,64
7	" . . . . .	"	15. XI. 1930	0,64, 0,62, 0,58, 0,62	0,62
8	" . . . . .	"	24. II. 1931	0,64, 0,64	0,64
9	Frau Jelenák . . . . .	Hypertonia. Status post apoplexiam	1. VII. 1930	0,65, 0,64, 0,64, 0,64, 0,63, 0,63	0,64
10	" Frau Vasteleki . . . . .	Hypertonia	3. IX. 1930	a) 0,66, 0,66 b) 0,69	0,66
11	Frau Zamenecskil . . . . .	Hypertonia. Mesoaortitis luetica	5. IX. 1930	0,68, 0,64, 0,62, 0,63, 0,63	0,64
12	" Kamocsay . . . . .	Hypertonia	5. IX. 1930	0,63, 0,62, 0,63, 0,65	0,63
13	" Bielik . . . . .	Arteriosclerosis; Hypertonia	13. IX. 1930	a) 0,67, 0,63 b) 0,66, 0,68	0,65
14	" . . . . .	"	22. V. 1931	a) 0,66, 0,62, 0,62 b) 0,65	0,67
15	Jesko. . . . .	Arteriosclerosis; Hypertonia	15. IX. 1930	a) 0,65, 0,63 b) 0,64, 0,64	0,65
16	Bedi. . . . .	Diabetes mellitus. Hypertonia	21. X. 1930	0,63 0,66 0,67 0,65	0,64
17	Oroß . . . . .	Nephritis chronica; Hemiplegia	6. XI. 1930	0,60, 0,58, 0,58, 0,60, 0,62, 0,62	0,60
18	Frau Iritz . . . . .	Nephritis chronica	17. XI. 1930	0,65	0,65
19	" Breuer . . . . .	Diabetes mellitus; Nephrosclerosis	29. XI. 1930	0,64, 0,63, 0,64, 0,64, 0,60, 0,62	0,63
20	" Grünfeld . . . . .	Nephrosclerosis; Myodeg. cordis	30. I. 1931	0,68, 0,68	0,68
21	" Weiß . . . . .	Nephrosclerosis	21. II. 1931	0,68 0,69	0,69
22	" . . . . .	"	6. III. 1931	0,64, 0,64	0,64
23	" Pül . . . . .	Hypertonia	6. V. 1931	0,65, 0,67	0,66
24	" Kocah . . . . .	"	12. V. 1931	0,67, 0,64, 0,65, 0,68, 0,66	0,66
25	" Szent . . . . .	Hypertonia; Angina pect.	12. V. 1931	0,60, 0,62	0,61
26	" Unger . . . . .	"	18. V. 1931	a) 0,66, 0,63 b) 0,63, 0,62	0,65
27	" Rapos . . . . .	Hypertonia	V. 1931	0,66, 0,65	0,66
28	" Janácskó . . . . .	"	28. V. 1931	0,66, 0,64	0,66
29	" Koptil . . . . .	"	29. V. 1931	0,65, 0,64	0,65
30	" Fünk . . . . .	"	2. VI. 1931	0,67, 0,66, 0,62	0,65
31	Frau Csiky . . . . .	"	2. VI. 1931	0,67, 0,67	0,67
32	" Szabó . . . . .	"	10. VI. 1931	0,62, 0,62	0,62

wurden. Wollen wir nur die 22 Analysen als richtig gelten lassen, so ist aus ihnen ein Mittelwert von 0,649 % zu errechnen; läßt man alle, auch die größeren und kleineren Werte gelten, so erhält man einen ganz ähnlichen Wert, nämlich 0,648 %.

Der Eisengehalt meiner Hämoglobinpräparate betrug im Mittel aller Bestimmungen 0,337 %<sup>1</sup>, also genau so viel wie im Hämoglobin aller anderen daraufhin untersuchten Blutarten, woraus sich als kleinstes Molekulargewicht die bekannte Zahl 16500 errechnen läßt. Hingegen ergibt sich aus dem 0,649 % betragenden Schwefelgehalt als kleinstes Molekulargewicht 4930 bzw. das Verhältnis  $\text{Fe}_3 : \text{S}_{10}$  und hieraus als kleinstes Molekulargewicht  $3 \cdot 16500 = 49500$ .

Es ist ja durchaus möglich, daß sich alles dies auch richtig so verhält und daß das menschliche Hämoglobin die obige Zusammensetzung hat. Doch könnte das nicht gerade einfache Verhältnis zwischen Eisen und Schwefel auch dadurch bedingt sein, daß es im menschlichen Blute zwei oder mehrere Hämoglobine von verschiedenem Schwefelgehalt<sup>2</sup> gibt, die nicht nur im Blute verschiedener Menschen, sondern auch an *einem* Menschen zu verschiedenen Zeiten in verschiedenen Mengenverhältnissen vertreten sein können. Die erstgenannte Möglichkeit könnte im Falle des *Orosz* (Präparat 17) vorliegen, der stets schwefelarmes Hämoglobin hatte; die zweite aber im Falle *Firczac*, der bei einer späteren Gelegenheit *scheinbar* schwefelärmeres Hämoglobin als vorangehend hatte. (Gerade der Fall *Firczac* läßt aber die kaum überwindlichen Schwierigkeiten erkennen, die aus Analysenfehlern hervorgehen; denn *eines* der von diesem Kranken herrührenden Hämoglobine hatte, zuerst untersucht, einen Schwefelgehalt von 0,68 bzw. 0,68, später aber einen solchen von 0,62 bzw. 0,62 %.)

Als Endergebnis meiner Versuche läßt sich aussagen, daß *das Hämoglobin des Menschen etwa 0,65 % Schwefel enthält. Möglicherweise sind in den roten Blutkörperchen des menschlichen Blutes Hämoglobine von verschiedenem Schwefelgehalt enthalten.*

---

<sup>1</sup> Siehe die Mitteilung von *Herzog* und *László*, die in dieser Zeitschrift veröffentlicht werden soll.

<sup>2</sup> Siehe hierüber auch *Valér*, l. c. S. 454.

*Sonderabdruck*  
aus „*Biochemische Zeitschrift*“ 255, 378, 1932.  
Verlag von *Julius Springer*, Berlin W 9.

# Über die Lichtabsorption des Globinhämochromogens und über seine Verwendbarkeit zur Bestimmung des Farbstoffgehaltes des Blutes.

Von  
Anna Dénes.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 20. September 1932.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Der seinerzeit als Hämochromogen bezeichneten Substanz, erhalten durch Reduktion von Hämoglobin oder Hämin in alkalischer Lösung, kommt seit den Untersuchungen von *Anson* und *Mirsky*<sup>1</sup> ein erhöhtes Interesse zu, indem diese Autoren zeigen konnten, a) daß es sich nicht, wie ursprünglich angenommen wurde, um das reine Reduktionsprodukt der eisenhaltigen Komponente des Blutfarbstoffs, sondern um dessen Verbindung mit Globin, dem Eiweißpaarling des Hämoglobins, handelt; b) daß man von „Hämochromogen“ schlechthin nicht reden kann, da es zahlreiche verschiedene Hämochromogene gibt, die sich der Reihe nach darstellen lassen, indem man das reduzierte Hämatin außer mit Globin auch mit anderen stickstoffhaltigen Substanzen, wie Ammoniak, Pyridin, Nicotin, Hydrazin usw., koppeln kann. Allen diesen Hämochromogenen kommt dasselbe zweibandige Absorptionsspektrum zu, allerdings mit geringen Unterschieden in der Lage der Absorptionsmaxima. Doch sei bemerkt, daß diese Unterschiede entweder tatsächlich bestehen oder aber vielleicht darauf zurückzuführen sind, daß die zur Darstellung von Hämochromogen verwendeten reduzierenden Stoffe meistens stickstoffhaltig waren, wie z. B. Schwefelammonium, Hydrazinhydrat usw., daher mit reduziertem Hämatin an sich schon Hämochromogene gebildet haben mochten. Aus diesen Ausführungen ergibt sich als interessantes Problem von physiologisch-chemischem Interesse die Bestimmung der Licht-

<sup>1</sup> J. of gen. Physiol. 12, 273, 1929.

absorption des aus Blut bzw. Hämoglobin verschiedener Tierarten bereiteten Hämochromogens, des sogenannten Globinhämochromogens, unter anderem auch mit Rücksicht auf die Möglichkeit, den Hämoglobingehalt einer Blutprobe auf Grund des in Globin-Hämochromogen verwandelten Hämoglobins zu bestimmen. Auf diese Probleme beziehen sich die Untersuchungen, über deren Ergebnisse nachfolgend berichtet werden soll.

#### A. Versuche an Globinhämochromogen, dargestellt aus Pferde-, Hunde- und Katzenhämoglobin.

Als Ausgangsmaterial diente frisch bereitetes, kristallisiertes Oxyhämoglobin vom Pferd, vom Hund und von der Katze. Die Kristalle wurden aus Pferde- und Katzenblut nach der Methode von *Willstätter* und *Pollinger*, aus Hundeblood nach der Methode von *Hoppe-Seyler* erhalten. Der Kristallkuchen wurde mehreremal mit eisgekühltem Wasser gewaschen; nur am Katzenhämoglobin konnte das Waschen infolge seiner großen Löslichkeit und der geringen Mengen, die ich erhielt, nicht vorgenommen werden. Aus dem Kristallkuchen, dessen Wasser- bzw. Hämoglobingehalt durch Trockensubstanzbestimmung ermittelt wurde, habe ich etwa 100 ccm bis etwa 0,3%ige Lösung bereitet, diese behufs Reduktion mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  in Pulverform und mit Lauge bis zu einer Konzentration von 0,6% versetzt. (Die Konzentration des verwendeten Alkalis war innerhalb gewisser Grenzen nicht von wesentlichem Einfluß auf die Lichtextinktion. Ich habe an demselben Hundehämoglobinpräparat vergleichende Versuche in 0,2-, 0,6- und 1,2%igen NaOH-Lösungen ausgeführt und die Unterschiede in den Extinktionskoeffizienten innerhalb der Fehlergrenzen gefunden.) Damit die Reduktion eine vollkommene sei, habe ich  $\frac{1}{2}$  Stunde lang zugewartet und dann die kirschroten Lösungen, deren Lichtabsorption, wenn sie von dem Luftsauerstoff bewahrt blieben, tagelang unverändert blieb, mit Hilfe eines von *Martens* und *Grünbaum* modifizierten *Königschen* Spektrophotometers längs des Spektralbereiches von 600 bis 500  $\mu\mu$  untersucht.

Als Lichtquelle diente eine Metallfadenglühlampe in Milchglasgehäuse. Der Objektivspalt war stets 0,1 mm breit, der Okularspalt umfaßte einen Spektralbereich, dessen Breite im Rot 15, im Blau 5  $\mu\mu$  betrug. Bei den großen Unterschieden der Lichtabsorption innerhalb dieses Spektralbereiches hatte ich die Wahl, um nicht allzu große bzw. allzu kleine Werte zu erhalten, die, wie bekannt, mit großen Fehlern behaftet sind, entweder die Konzentration der Lösung, oder aber die Schichtdicke zu wechseln. Ich wählte letzteres und führte die Ablesungen in Schichtdicken von 50 mm bis hinunter zu 1 mm aus, und zwar an den meisten Stellen bloß in den vier Quadranten, an den wichtigeren Stellen (z. B. an denen der Maxima) dreimal in jedem der vier Quadranten.

Da die Lösungen in den verschiedenen Versuchsreihen von sehr verschiedener Konzentration waren (0,06 bis 0,28%), mußte die Lichtabsorption, um verglichen werden zu können, in sogenannten spezifischen Extinktionskoeffizienten ausgedrückt, d. h. auf 0,1% ursprünglichen Oxyhämoglobingehalt bezogen werden. Die Konzentration der untersuchten Lösungen ergab sich a) aus der genau abgewogenen Menge

Tabelle I. Spezifische Extinktionskoeffizienten des Globinhämochromogens.

Mitte des Spektral- ausschnittes $\mu\mu$	Vom Pferd				Vom Hund				Von der Katze			
	Präparat I	Präparat II	Präparat III	Präparat IV	Präparat I	Präparat II	Präparat III	Präparat IV	Präparat I	Präparat II	Präparat III	
	600,8	—	—	—	—	0,029	—	—	—	—	—	—
590,8	—	—	0,047	—	0,045	—	—	—	—	—	—	0,041
579,8	—	—	0,081	—	0,088	—	—	—	—	—	—	—
568,0	0,321	—	0,326	—	0,343	—	—	—	—	—	—	—
560,8	—	—	—	—	1,54	—	—	—	—	—	—	—
558,4	1,58	1,60	1,60	1,54	1,54	—	—	—	—	—	—	—
557,1	1,70	1,71	1,70	1,66	1,64	—	—	—	—	—	—	—
555,8	1,71	1,74	1,77	1,71	1,68	—	—	—	—	—	—	—
554,8	1,61	1,70	1,71	1,65	1,65	—	—	—	—	—	—	—
553,5	1,58	1,61	1,63	1,53	1,58	—	—	—	—	—	—	—
552,9	1,51	1,53	1,55	1,47	1,50	—	—	—	—	—	—	—
551,7	1,35	1,37	1,40	1,34	1,38	—	—	—	—	—	—	—
543,7	0,600	0,619	0,598	0,629	0,614	—	—	—	—	—	—	—
542,3	0,560	0,591	0,568	0,589	0,587	—	—	—	—	—	—	—
541,2	0,543	0,563	0,542	0,573	0,568	—	—	—	—	—	—	—
540,0	0,535	0,552	0,535	0,564	0,553	—	—	—	—	—	—	—
539,0	0,538	0,542	0,540	0,567	0,559	—	—	—	—	—	—	—
537,8	0,551	0,560	0,557	0,575	0,573	—	—	—	—	—	—	—
537,4	—	—	—	—	0,572	—	—	—	—	—	—	—
536,8	0,564	0,577	0,573	0,589	0,586	—	—	—	—	—	—	—
535,2	0,607	0,631	0,619	0,625	0,638	—	—	—	—	—	—	—
534,2	0,632	0,651	0,642	0,657	0,661	—	—	—	—	—	—	—
529,6	0,784	0,786	0,802	0,789	0,786	—	—	—	—	—	—	—
528,5	0,804	0,813	0,824	0,796	0,809	—	—	—	—	—	—	—
528,0	0,806	0,818	0,832	0,804	0,820	—	—	—	—	—	—	—
527,1	0,822	0,829	0,832	0,805	0,813	—	—	—	—	—	—	—
526,1	0,812	0,823	0,834	0,801	0,814	—	—	—	—	—	—	—
525,2	0,799	0,803	0,812	0,793	0,810	—	—	—	—	—	—	—
524,3	0,783	0,785	0,787	0,773	0,776	—	—	—	—	—	—	—
520,5	0,662	0,674	0,654	0,666	0,687	—	—	—	—	—	—	—
514,9	—	0,516	0,517	0,517	—	—	—	—	—	—	—	—
510,0	—	0,382	0,379	0,388	—	—	—	—	—	—	—	—
500,4	—	0,228	0,226	0,232	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle II.

Mittelwerte der spezifischen Extinktionskoeffizienten des Globinhämochromogens.

Mitte des Spektralausschnittes $\mu\mu$	vom Pferd	vom Hund	von der Katze	Gesamtmittelwert
600,8	—	0,029	0,029	0,029
590,8	0,047	0,047	0,041	0,045
579,8	0,081	0,088	—	0,085
568,0	0,324	0,343	0,304	0,324
560,8	—	1,25	1,20	1,23
558,4	1,58	1,55	1,56	1,56
557,1	1,69	1,67	1,68	1,68
555,8	1,73	1,71	1,73	1,72
554,8	1,67	1,65	1,68	1,67
553,5	1,59	1,57	1,60	1,59
552,9	1,52	1,50	1,54	1,52
551,7	1,37	1,37	1,39	1,38
543,7	0,612	0,608	0,603	0,608
542,3	0,577	0,578	0,566	0,574
541,2	0,555	0,561	0,546	0,554
540,0	0,546	0,547	0,537	0,543
539,0	0,547	0,555	0,538	0,547
537,8	0,561	0,567	0,550	0,559
537,4	—	0,569	0,555	0,562
536,8	0,576	0,581	0,572	0,576
535,2	0,620	0,628	0,610	0,619
534,2	0,646	0,655	0,643	0,648
529,6	0,790	0,792	0,779	0,787
528,5	0,809	0,809	0,801	0,806
528,0	0,815	0,815	0,809	0,813
527,1	0,822	0,823	0,817	0,821
526,1	0,817	0,812	0,809	0,813
525,2	0,802	0,800	0,797	0,800
524,3	0,781	0,778	0,779	0,780
520,5	0,664	0,672	0,668	0,668
514,9	0,517	0,510	0,518	0,515
510,0	0,383	—	0,383	0,383
500,4	0,229	—	0,232	0,231

des Oxyhämoglobins, die dem Kristallkuchen entnommen wurde, und b) aus dem Trockensubstanzgehalt des letzteren. Zur Bestimmung des Trockensubstanzgehalts wurden zwei bis drei genau abgewogene Portionen des Kristallkuchens bei mäßiger Wärme getrocknet, lufttrocken wieder gewogen, fein pulverisiert, genau gewogene Mengen des Pulvers bei 105° C im Glycerintrockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Diese spezifischen Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle I, die Mittelwerte von je einer Tierart in Tabelle II zusammengestellt.

Die Übereinstimmung der für je einen Spektralausschnitt erhaltenen Werte ist eine recht gute, sei es bezüglich der Versuchsreihen, die sich auf eine Tierart beziehen, sei es beim Vergleich der Mittelwerte

der auf verschiedene Tierarten bezüglichen Daten. Diese Mittelwerte habe ich als Ordinaten in ein Koordinatensystem eingetragen, auf dessen Abszissenachse die Wellenlängen verzeichnet sind; auf diese Weise entstand die in Abb. 1 wieder-

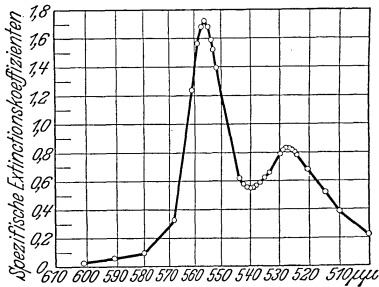


Abb. 1.

gegebenen Absorptionskurve des Globinhämochromogens.

Aus obiger quantitativer Übereinstimmung folgt unmittelbar die qualitative: Die Lage der beiden Absorptionsmaxima und des dazwischenliegenden Minimums ist, wie schon *Anson*, *Barcroft*, *Mirsky* und *Oinuma*<sup>1</sup> gefunden haben, bezüglich der drei genannten Tierarten die gleiche. Das eine sehr scharfe

Maximum liegt bei 555,8 μμ, das zweite weit schwächere bei 527,1 μμ und das Minimum zwischen den beiden bei 540,0 μμ. *Hoppe-Seyler*<sup>2</sup> fand die Maxima bei 556,0 und 520,4 μμ, *L. Lévy*<sup>3</sup> bei 556,4 und 520,4 μμ, *S. Bleszczyńska*<sup>4</sup> bei 559,8 und 529,0 μμ.

Aus den spezifischen Extinktionskoeffizienten, an den Stellen der beiden Maxima berechnet, ergeben sich für das Absorptionsverhältnis die Werte  $A_{555,8} = 0,0005814$  und  $A_{527,1} = 0,001218$ .

### B. Versuche an Globinhämochromogen, dargestellt aus Rinder- und Menschenhämoglobin.

Während, wie vorangehend gezeigt wurde, die Lichtabsorption des Globinhämochromogens aus Pferde-, Hunde-, Katzenhämoglobin eine weitgehende Übereinstimmung zeigt, verhalten sich die aus Rinderhämoglobin bereiteten Hämochromogenlösungen anders, indem anfangs sogar die parallelen Versuchsreihen sehr bedeutende Unstimmigkeiten aufwiesen, die erst in weiteren Versuchsreihen, und auch da nicht vollkommen, behoben werden konnten. Es zeigte sich nämlich, daß die Reduktion in alkalischer Lösung hier weit langsamer vor sich geht als an den anderen Hämoglobinarten, was sich vollkommen mit der von *Krüger*<sup>5</sup> zuerst beobachteten Tatsache der auffallend schweren Abspaltbarkeit der eisenhaltigen Komponente aus Rinderoxyhämoglobin deckt. Dann ist es aber begreiflich, daß, wenn die Ablesungen nach

<sup>1</sup> Proc. Roy. Soc. London (B.) 97, 61, 1925.

<sup>2</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 477, 1889.

<sup>3</sup> Ebenda.

<sup>4</sup> Recherches sur les Hémochromogènes et sur les Hématines réduites libres ou combinées. Paris, Imprimerie P. et A. Davy, 1928, S. 10.

<sup>5</sup> Zeitschr. f. vergl. Physiol. 2, 254, 1925.



einer halben Stunde begonnen werden, in verschiedenen Versuchsreihen verschiedenste Werte erhalten werden können, da ja die Spaltung des Blutfarbstoffmoleküls zu dieser Zeit noch nicht vollendet ist bzw. ganz verschieden weit vorgeschritten sein kann. Wenn auch nicht tadellose, doch brauchbare Resultate sind nur zu erhalten, wenn man entweder, wie bei den anderen Blutarten, 0,6% Lauge verwendet, jedoch nicht  $\frac{1}{2}$  Stunde, sondern mindestens 24 Stunden lang stehen läßt; oder aber, wenn man eine etwa zehnmal stärkere Lauge verwendet. Unter diesen Umständen können aber entweder während des langen Stehens, oder aber infolge der starken Laugenwirkung Nebenvorgänge einsetzen (Neubildung oder Abblässen von Farbstoffen), denen zufolge sich störende Unterschiede in den parallelen Versuchsreihen einstellen. Immerhin gaben aber vier an Rinderglobinhämochromogen ausgeführte, hier nicht näher mitgeteilte Versuchsreihen im Mittelwert einen ähnlichen Verlauf der Absorptionskurve, wie auf S. 382 abgebildet ist. Namentlich ergab sich auch, daß sich die zwei Maxima bei 555,8 bzw. bei 527,1  $\mu\mu$ , das dazwischengelegene Minimum bei 540,0  $\mu\mu$ , also an denselben Stellen befinden, wie bezüglich des Pferde-, Hunde- und Katzensglobinhämochromogens gezeigt wurde, und daß auch die spezifischen Extinktionskoeffizienten an diesen Stellen denselben Wert haben: 1,78 bzw. 0,833 bzw. 0,543 (bei den erwähnten anderen Hämochromogenen 1,72 bzw. 0,821 bzw. 0,543).

Aus kristallisiertem, nach *Aszódi*<sup>1</sup> aus Menschenblut hergestelltem Hämoglobin wurden ebenfalls Lösungen von Globinhämochromogen und zwar in drei Versuchsreihen hergestellt und ihre Lichtabsorption bestimmt. Die Divergenzen zwischen den parallelen Werten waren hier teilweise noch größer als an Rinderglobinhämochromogen, daher nur das wichtigste Ergebnis mitgeteilt sei, darin bestehend, daß a) sich die beiden Maxima und das Minimum wieder an den oben erwähnten Stellen fanden, b) die spezifischen Extinktionskoeffizienten einen von den obigen etwas abweichenden Wert haben, und zwar 1,83 bzw. 0,862 bzw. 0,579.

### C. Hämoglobinbestimmungen im Vollblut auf Grund des Globinhämochromogengehaltes.

Die Spektrophotometrie wurde seinerzeit von *Vierordt* zur Konzentrationsbestimmung von Farbstoffen in verschiedenen physiologischen Flüssigkeiten, dann von *Hüfner* zur Konzentrationsbestimmung des Hämoglobins im Blute vorgeschlagen. In der Tat läßt sich in reinen Lösungen von Hämoglobin die Konzentration auf Grund der Gleichung  $c = \varepsilon A$  (wo man mit  $c$  die in Gramm ausgedrückte Menge des in 1 ccm der Lösung enthaltenen Farbstoffs, mit  $\varepsilon$  der aus den Ablesungen berechnete Extinktionskoeffizient, mit  $A$  aber eine Konstante, von *Vierordt*

<sup>1</sup> Diese Zeitschr. 252, 212, 1932.

als Absorptionsverhältnis bezeichnet) mit hinreichender Genauigkeit feststellen, jedoch nicht mit derselben Sicherheit im Blute. Die Vorbedingung einer solchen Bestimmung ist nämlich, daß die Lichtabsorption aller anderen im Blute anwesenden Farbstoffe im Vergleich zu der des Hämoglobins vernachlässigt werden könne, das Blut sich aber in bezug auf seine Lichtabsorption so verhalte, wie eine Lösung von reinem Hämoglobin. Das sichere Kriterium einer solchen Reinheit ist aber das Verhalten des Quotienten der Extinktionskoeffizienten an zwei bestimmten Stellen des Spektrums, und zwar an den beiden bereits erwähnten, von *Hüfner* hierfür gewählten Stellen 560,8 und 537,4  $\mu\mu$ . In reinen Lösungen von Oxyhämoglobin erhält man für diesen Quotienten stets 1,58 bzw. nach späteren Autoren etwa 1,60, hingegen nach den Erfahrungen in diesem Institut auch in solchen Blutproben, in denen sicher alles Hämoglobin durch Schütteln mit Luft oder mit Sauerstoff in Oxyhämoglobin verwandelt wurde, zuweilen erheblich geringere Werte. Dann ist aber eine richtige Berechnung der Hämoglobinkonzentration aus den Extinktionskoeffizienten und dem Absorptionsverhältnis unmöglich. Nun war aber die Möglichkeit gegeben, daß das im Vollblut enthaltene Hämoglobin, einmal in Hämochromogen verwandelt, sich für obige Zwecke besser als das Oxyhämoglobin verwenden läßt; einmal, da seine maximale Lichtabsorption etwa doppelt so groß ist als die des Oxyhämoglobins, daher die störende Wirkung der fremden lichtabsorbierenden Stoffe halb so groß ins Gewicht fällt, andererseits, weil z. B. auch die Sorge für entsprechende Sättigung mit Sauerstoff hier entfällt. Als Kriterium der Reinheit kann auch hier der Quotient der Extinktionskoeffizienten an zwei Stellen des Spektrums dienen; doch mußten hier andere als die von *Hüfner* vorgeschlagenen Stellen gewählt werden, da bei 560,8  $\mu\mu$  die Absorptionskurve des Hämochromogens sehr steil ansteigt, daher der geringste Fehler in der Einstellung des erwünschten Spektralausschnittes an sich schon zu sehr bedeutenden Abweichungen führt. Hingegen ist für diese Zwecke das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten an den Stellen der beiden Maxima, also  $\epsilon_{555,8} : \epsilon_{527,1}$ , sehr geeignet. Aus den Mittelwerten der jeweils am Globinhämochromogen des Pferdes, der Katze und des Hundes erhaltenen Daten der Tabelle II lassen sich für jenen Quotienten die Werte 2,10 bzw. 2,12 bzw. 2,07 errechnen. Da der maximale Unterschied zwischen diesen Zahlen nicht mehr als 2,5% ausmacht, ist es durchaus gerechtfertigt, für den Quotienten einen Gesamtmittelwert von 2,10 einzustellen. (Aus den weniger gut übereinstimmenden, an Rinder- und Menschenhämochromogen erhaltenen Daten lassen sich die Quotienten 2,16 bzw. 2,11, also ganz ähnliche Werte, errechnen.)

Nun fragt es sich, ob dieser Quotient auch für das Globinhämochromogen im Vollblut gültig ist; denn nur in diesem Falle kann man

Tabelle III.

Blutart	Blut cem	Verdünnt auf cem	$\epsilon_{555,8}$ a	$\epsilon_{527,1}$ b	$\epsilon_{555,8} : \epsilon_{527,1}$	Hämoglobingehalt in %	
						aus a	aus b
1. Hund . .	0,5	100	1,618	0,784	2,06	18,8	19,1
2. " . .	0,5	100	1,621	0,798	2,03	18,8	19,4
3. " . .	0,5	100	1,539	0,743	2,07	17,9	18,2
4. " . .	0,4	100	1,191	0,575	2,07	17,3	17,5
5. " . .	1,5	100	3,289	1,587	2,07	12,7	12,9
6. " . .	0,4	100	1,415	0,685	2,07	20,7	20,9
7. " . .	0,4	100	1,240	0,599	2,07	18,0	18,2
1. Mensch .	0,4	100	1,132	0,545	2,03	16,4	16,6
2. " . .	0,4	100	1,225	0,585	2,09	17,8	17,8
3. " . .	0,2	50	1,220	0,585	2,09	17,7	17,8
4. " . .	0,4	100	1,005	0,476	2,11	14,6	14,5
1. Kaninchen	0,5	100	1,186	0,568	2,09	13,8	13,8
2. " . .	0,5	100	1,119	0,534	2,09	13,0	13,0
3. " . .	0,5	100	1,348	0,654	2,06	15,7	15,9
4. " . .	0,5	100	1,145	0,537	2,13	13,5	13,1

daran denken, den Farbstoffgehalt des Blutes aus den Extinktionskoeffizienten an den beiden genannten Spektralstellen mit Hilfe der für  $A$  ermittelten Konstanten zu ermitteln und so zwei übereinstimmende, daher auch verlässliche Werte zu erhalten. In Tabelle III habe ich die Ergebnisse einiger Versuche zusammengestellt, aus denen hervorgeht, daß der in obigem vorgeschlagene Weg wohl gangbar ist. Hunden wurde ein genau abgemessenes Volumen Blut entnommen, mit verdünnter Lauge entsprechend verdünnt, mittels  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  reduziert, nach einer halben Stunde an den Spektralstellen 555,8 und 527,1  $\mu$  die Extinktionskoeffizienten bestimmt und deren Quotienten berechnet. Wie zu ersehen ist, hatten die Quotienten durchweg angenähert denselben Wert wie in den an reinen Hämochromogenlösungen angeführten Versuchen, woraus gefolgert werden kann, daß an der Lichtabsorption der Blutproben andere Farbstoffe nicht beteiligt sind. Dementsprechend konnte auch mit Hilfe der  $A$ -Werte und unter Berücksichtigung der stattgehabten Verdünnung der Hämoglobingehalt der Blutproben berechnet werden, und zwar mit dem Ergebnis, daß die an den beiden Spektralstellen erhaltenen Werte miteinander gut, oft vorzüglich übereinstimmen. Des weiteren habe ich auch einige Versuche an Menschenblut ausgeführt. Auch hier stimmte der Wert der Quotienten, ob in Lösungen von reinem Hämoglobin, ob in verdünntem Blute bestimmt, überein, so daß die Berechnung der Konzentration auch hier an zwei Spektralstellen möglich war. Nun hatte ich die Wahl, mit den an Pferde-Hunde- und Katzenhämochromogen mit großer Sicherheit ermittelten  $A$ -Werten zu rechnen, oder aber diese Konstanten aus den an Menschen-Globinhämochromogen erhaltenen, weniger sicher festgestellten Ex-

tinktionskoeffizienten abzuleiten. Ich wählte den erstgenannten Vorgang. Endlich habe ich auch einige Bestimmungen an Kaninchenblut vorgenommen. Da ich für den Quotienten auch hier denselben Wert erhielt, hielt ich mich für berechtigt, der Konzentrationsberechnung obige  $A$ -Werte zugrunde zu legen. Die an beiden Spektralstellen erhaltenen Werte stimmten gut miteinander überein.

In dieser auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. P. Hári ausgeführten Arbeit wurde

1. die Lichtabsorptionskurve des Pferde-, Hunde-, Katzen-Globinhämochromogens bestimmt und gleich verlaufend gefunden (Globinhämochromogen vom Rind und vom Menschen haben einen etwas abweichenden Verlauf);

2. gefunden, daß ein Maximum der Lichtabsorption bei  $555,8 \mu\mu$ , ein zweites bei  $527,1 \mu\mu$ , dazwischen ein Minimum bei  $540,0 \mu\mu$  gelegen ist;

3. aus den Extinktionskoeffizienten an den Stellen der beiden Maxima das Absorptionsverhältnis (Vierordt) zu  $A_{555,8} = 0,0005814$ ,  $A_{527,1} = 0,001218$ , der Quotient  $\epsilon_{555,8} : \epsilon_{527,1}$  zu  $2,10$  gefunden;

4. gezeigt, daß aus den an diesen beiden Stellen abgelesenen Extinktionskoeffizienten und obigen  $A$ -Werten der Farbstoffgehalt des Blutes berechnet werden kann.

*Sonderabdruck*  
aus „*Biochemische Zeitschrift*“ **256**, 308, 1932.  
Verlag von *Julius Springer*, Berlin W 9.

# Über die Verteilung des Zuckers im Blute und über die Zuckerpermeabilität der roten Blutkörperchen.

Von  
Ladislau Mosonyi.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der kgl. ung. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 25. Oktober 1932.)

Das Problem der Verteilung des Zuckers im Blute zwischen Plasma und Blutkörperchen im Zusammenhang mit der Zuckerpermeabilität der roten Blutkörperchen scheint an sich nicht sehr verwickelt zu sein und läßt sich in folgende Einzelprobleme sondern:

a) Besteht im kreisenden Blute des normalen Tieres kein Unterschied im Zuckergehalt der Blutkörperchen und des Blutplasmas, so muß hieraus geschlossen werden, daß die Körperchen für den Zucker *leicht und vollkommen* permeabel sind; in diesem Falle muß, wenn man Zucker in den Kreislauf einbringt, der Zuckergehalt der Blutkörperchen und des Plasmas nach einer kurzen Übergangszeit gleich stark erhöht gefunden werden.

b) Würden die Blutkörperchen gewisser Tierarten zuckerfrei gefunden, so würde erwiesen sein, daß diese Blutkörperchen für Zucker *nicht permeabel* sind.

c) Findet sich ein regelmäßiger Unterschied im Zuckergehalt der Blutkörperchen und des Plasmas im kreisenden Blute, und stellt sich dieses Gleichgewicht nach Einbringung von Zucker erst allmählich wieder ein, so folgt hieraus, daß die Blutkörperchen für den Zucker *schwer permeabel* sind. In solchen Fällen kann man aus wiederholten, in gewissen Zeiträumen ausgeführten gleichzeitigen Zuckerbestimmungen in Blutkörperchen und Plasma Aufschluß über den zeitlichen Verlauf des Eintritts des Zuckers in die Blutkörperchen gewinnen, indem sich das Verhältnis zwischen der Zuckerkonzentration in Blutkörperchen und Plasma in der einen oder in der anderen Richtung ändern muß.

d) Durch gewisse Eingriffe (z. B. Einbringung von Insulin) wird die Verteilung des Zuckers zwischen Blutkörperchen und Plasma

geändert; es muß untersucht werden, ob diese Änderung mit einer geänderten Permeabilität der Blutkörperchen in Verbindung gebracht werden kann oder nicht.

Auf die Literatur über die Zuckerpermeabilität der Blutkörperchen will ich an dieser Stelle nicht, und auch im weiteren Verlauf dieser Erörterungen nur ganz kurz eingehen; es sei nur folgendes hervor-gehoben.

Zuckergehalt und -permeabilität der roten Blutkörperchen sind Fragen, die eng miteinander verbunden sind; doch geschieht ihre Feststellung auf verschiedenen Wegen, denn die erstgenannte Frage bezieht sich auf einen gegebenen Zustand, die zweitgenannte auf einen in der Zeit verlaufenden Vorgang. Bezüglich gewisser Blutkörperchenarten ist es auf Grund der vorliegenden Angaben kaum möglich, mit Sicherheit anzugeben, ob sie Zucker enthalten oder nicht, bzw. ob sie für Zucker durchlässig sind oder nicht. Die Schwierigkeiten sind um so größer, da sich viele Angaben nicht auf das Verhalten der in ihrem natürlichen Milieu, im Plasma, suspendierten Blutkörperchen beziehen, sondern auf Blutkörperchen, die aus dem Blute isoliert und mit verschiedenen Lösungen behandelt wurden. Daß es bei diesem Stande der Dinge, und weil auf den engen Zusammenhang zwischen Zuckergehalt und -permeabilität nicht geachtet wird, zu Widersprüchen kommt, ist nicht zu verwundern; so z. B. daß von derselben Blutkörperchenart an einer Stelle angegeben wird, daß sie Zucker enthalten, an einer anderen, daß sie für Zucker impermeabel sind! Die Unwahrscheinlichkeit bzw. der Widerspruch in dieser Angabe ist augenscheinlich.

Nachstehend soll über Versuche berichtet werden, die ich an Blut von Menschen und Hunden unter verschiedenen Versuchsbedingungen ausgeführt habe, und die geeignet sind, einiges zur Klärung der ob-schwebenden Fragen beizutragen. In ihrer Einrichtung lehnen sie sich an die von *Wiechmann*<sup>1</sup> und *Rona* und *Sperling*<sup>2</sup> an.

### I. Methodik meiner Versuche.

Als wichtigstes Moment erachtete ich es, die Versuche an unmittelbar vorher entnommenem Vollblut und daraus vorbereitetem Plasma, also nicht etwa an defibriniertem Blute, an gewaschenen Blutkörperchen usw. aus-zuführen. Das Blut wurde durch Venaepunktion (in der Ellenbeuge am Menschen, an der unteren Extremität an Hunden) entnommen; a) ein Teil (10 ccm) des Blutes wurde in eine paraffinierte Schale fließen gelassen und dieser die zur Zuckerbestimmung im Vollblut nötigen Mengen entnommen; b) 10 ccm des Blutes wurden ohne jeden gerinnungshemmenden Zusatz in mit Paraffin ausgegossenen Röhren so lange (5 Minuten) zentrifugiert, bis etwa 2 ccm noch ungeronnenes Plasma abgehoben werden konnten; c) gleich-zeitig wurde Blut in zwei etwa 150 mm lange, den *Kottmanns*chen ähnliche Kapillarröhren aufgesogen, mit  $2\frac{1}{2}\%$ iger Bichromatlösung im Röhrchen verdünnt und 1 Stunde lang scharf zentrifugiert. Aus den nach 10 Mi-nuten ( $t_1$ ) und nach 1 Stunde ( $t_2$ ) abgelesenen Stande der Blutkörperchen-

<sup>1</sup> Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 41, 462, 1924.

<sup>2</sup> Diese Zeitschr. 175, 253, 1926.

säulen ( $v_1$  und  $v_2$ ) konnte das korrigierte Blutkörperchenvolumen auf Grund folgender, von *Hirota*<sup>1</sup> empfohlenen Formel ermittelt werden:

$$V = \frac{t_2 - t_1}{\frac{t_2}{v_2} - \frac{t_1}{v_1}}.$$

Das Blutkörperchenvolumen, in den Tabellen überall als KV bezeichnet, diente zur Berechnung des Zuckergehaltes der Blutkörperchen aus dem des Vollblutes und des Blutplasmas, indem der prozentuale Zuckergehalt der Blutkörperchen gleich ist:

$$\frac{\left( \text{Vollblutzucker-\%} - \frac{\text{Plasmazucker-\%} \times \text{Plasmavolum-\%}}{100} \right) 100}{\text{Blutkörperchenvolum \%}} = \frac{100 \text{ Vollblutzucker-\%} - \text{Plasmazucker-\%} \times \text{Plasmavolum-\%}}{\text{Blutkörperchenvolum-\%}}$$

Der Zuckergehalt im Vollblut und im Plasma wurde jedesmal in je 0,1 ccm nach *Hagedorn* und *Jensen* bestimmt, und zur Berechnung der Endergebnisse im Falle höherer Zuckerkonzentrationen die von mir ausgearbeitete Tabelle I\* benutzt.

Es wurden ausgeführt Versuche: a) an nüchternen Menschen und Hunden, b) mit Zuckerbelastung an normalen Menschen und Hunden, c) mit Zuckerbelastung an pankreasdiabetischen Hunden, d) Insulinversuche an normalen Hunden, e) Insulinversuche an pankreasdiabetischen Hunden.

In allen diesen Versuchen wurden die Bestimmungen zunächst an Menschen bzw. an Hunden im nüchternen Zustande ausgeführt, sodann folgte der betreffende Eingriff (Einbringung von Zucker, Einspritzung von Insulin).

In der jeder einzelnen Versuchsgruppe beigegebenen Tabelle ist das Ergebnis der direkten Bestimmung der Zuckerkonzentration im Vollblut und im Plasma, sowie die hieraus berechnete Zuckerkonzentration in den Blutkörperchen angegeben, ferner die Blutkörperchenzuckerkonzentration in Prozenten der Plasmazuckerkonzentration ausgedrückt, und im Text sowohl wie in den Tabellen überall als V.-Zahl (Verhältniszahl) bezeichnet.

## II. Versuchsergebnisse.

### a) Verteilung des Zuckers im Blute normaler Menschen und Hunde.

Zur Beurteilung einer etwaigen Einwirkung verschiedener Momente auf die Verteilung des Zuckers im Blute war es wünschenswert, zunächst ins klare zu kommen, wie diese Verteilung an normalen Individuen beschaffen ist, um so eher, da die Ansichten hierüber auch in den neuesten Mitteilungen nicht einheitlich sind.

In der Tabelle I sind die Werte zusammengestellt, die ich an gesunden jungen Männern, denen Blut im nüchternen Zustande entnommen wurde, erhielt. Die V.-Zahl betrug im Mittelwert aller Versuche 76; die Zuckerkonzentration ist also in den Blutkörperchen um den vierten Teil kleiner

<sup>1</sup> J. of Biophys. 1, 233, 1925.

\* Diese Zeitschr. 238, 95, 1931.



als im Plasma. Ähnliche Verhältnisse wie an Menschen habe ich auch an Hunden gefunden, mit dem Unterschied, daß die Blutkörperchen hier im Vergleich zum Plasma noch weniger Zucker, und zwar im Mittelwert aller Versuche 65% des Plasmazuckers enthalten, in guter Übereinstimmung mit *Fontès* und *Thivolle*<sup>1</sup>, die im Durchschnitt von neun Versuchen 69 erhielten. Die in der Tabelle II zusammengestellten Werte sind dieselben, die auch in den späteren Tabellen III und VIII als Nüchternwerte enthalten sind; sie wurden jedesmal vor dem auf seine Wirkung hin zu untersuchenden Eingriff erhalten.

Tabelle I.

## Nüchternwerte an gesunden Menschen.

Name	Zuckerkonzentration in ‰			V.-Zahl	Bemerkungen
	im Vollblut	im Plasma	in d. Blutkörperchen		
M. L. . . .	0,088	0,102	0,074	73	3. XII. 1930; KV. = 50%
C. L. . . .	0,091	0,107	0,069	65	12. XII. 1930; KV. = 42%
S. G. . . .	0,087	0,098	0,077	78	13. XII. 1930; KV. = 49%
S. J. . . .	0,087	0,098	0,070	71	31. XII. 1930; KV. = 43%
J. J. . . .	0,102	0,113	0,091	80	6. I. 1931; KV. = 51%
N. G. . . .	0,088	0,100	0,075	75	7. I. 1931; KV. = 49%
R. Z. . . .	0,104	0,111	0,096	86	17. II. 1931; KV. = 50%
F. P. . . .	0,102	0,112	0,092	82	18. II. 1931; KV. = 51%
P. J. . . .	0,104	0,111	0,098	88	21. II. 1931; KV. = 52%
	Mittelwert:			<b>76</b>	

Tabelle II.

## Nüchternwerte an normalen Hunden.

Hund	Zuckerkonzentration in ‰			V.-Zahl	Bemerkungen
	im Vollblut	im Plasma	in d. Blutkörperchen		
Zinnober .	0,104	0,128	0,083	65	21. XI. 1930; KV. = 51%
Boletta . .	0,096	0,131	0,062	47	28. XI. 1930; KV. = 51%
Róka . . .	0,080	0,116	0,058	50	10. XI. 1931; KV. = 62%
	0,084	0,110	0,068	62	19. XI. 1931; KV. = 63%
	0,105	0,117	0,098	84	31. XII. 1931; KV. = 62%
	0,101	0,137	0,082	60	5. I. 1932; KV. = 66%
	0,114	0,134	0,100	74	8. I. 1932; KV. = 60%
Farkas . .	0,093	0,101	0,088	88	19. I. 1932; KV. = 63%
	0,100	0,126	0,080	63	26. I. 1932; KV. = 56%
Cigány . .	0,108	0,130	0,092	71	1. II. 1932; KV. = 58%
	0,088	0,110	0,072	65	3. II. 1932; KV. = 58%
Bandi . . .	0,110	0,123	0,096	78	14. I. 1932; KV. = 48%
	0,091	0,111	0,072	65	21. II. 1932; KV. = 52%
	0,093	0,127	0,063	50	3. III. 1932; KV. = 51%
	0,095	0,129	0,074	57	17. III. 1932; KV. = 62%
	Mittelwert:			<b>65</b>	

<sup>1</sup> C. r. d. l. Soc. de Biol. 100, 1198, 1929.

Um nur die neueste Literatur bezüglich des Menschenblutes zu berücksichtigen, sei erwähnt, daß der von *Sribner* und *Rappaport*<sup>1</sup> allerdings nur an drei Menschen erhaltene Wert 80, der von *Somogyi*<sup>2</sup> an 36 Menschen erhaltene aber 77 beträgt, also beinahe dasselbe, wie in meinen Versuchen. (Bei *Somogyi* ist nur der reine vergärbare Zucker in Betracht gezogen, nicht aber die Summe aller reduzierenden Substanzen.) Demgegenüber seien die wesentlich abweichenden Schlußfolgerungen von *Wiechmann*<sup>3</sup> näher besprochen. Es handelt sich hier um 15 Menschen, an denen für die V.-Zahl 90 bis 113 erhalten und hieraus gefolgert wurde, daß der Zuckergehalt in Blutkörperchen und Plasma des Menschen derselbe sei. Nun ist aber zu bedenken, daß in 12 von den 16 Blutproben als V.-Zahl bloß 90 bis 97 gefunden wurden, und nur in vier anderen 100 bzw. weit mehr als 100. Ich stehe nicht an, für diese letzteren vier Fälle Bestimmungsfehler anzunehmen (wie solche in Serienversuchen kaum zu vermeiden sind, und sicherlich auch mir untergekommen sind) und auch aus *Wiechmanns* Versuchen zu schließen, daß die *Zuckerkonzentration der Blutkörperchen kleiner ist als die des Plasmas*. Ebenso wenig kann ich, wenigstens bezüglich meiner Versuche *Wiechmanns* Annahme gelten lassen, wonach der von ihm bestrittene geringere Zuckergehalt der Blutkörperchen von glykolytischen Vorgängen herrührt, denen zufolge in der Blutprobe während der Zeit von ihrer Entnahme bis zu ihrer Aufarbeitung Zucker aus den Blutkörperchen schwindet. Da es mir nämlich infolge der entsprechenden Mit-hilfe im Laboratorium möglich war, zwei Blutproben sofort nach ihrer Entnahme zur Gewinnung von Plasma zu zentrifugieren, und unterdessen aus einer dritten Blutprobe je 0,10 ccm zur Bestimmung des Vollblut-zuckers abzumessen, kann angesichts der kaum 1 bis 2 Minuten währenden Zeit, die hierzu benötigt wurde, von einer Glykolyse bei der Vollblut-analyse keine Rede sein, bei der Plasmaanalyse kommt sie aber überhaupt nicht in Betracht. Aber umgekehrt lassen sich gewisse Bedenken gegen den Zusatz der die Glykolyse hemmen sollenden Reagenzien in *Wiechmanns* Versuchen nicht verschweigen, kann durchaus möglich, daß diese Zusätze die Blutkörperchen bzw. ihre in betreff der Permeabilität maßgebenden äußeren Schichten, ohne eine wirkliche Hämolyse zu verursachen, derart schädigen, daß ihre Permeabilität geändert, z. B. erhöht wird, demzufolge dann einfach infolge des Konzentrationsgefälles aus dem zuckerreichen Plasma mehr Zucker in das Innere der zuckerärmeren Blutkörperchen gelangt, und *Wiechmann* auf diese Weise zu den höheren V.-Zahlen kommt.

Bezüglich des Mechanismus der von den oben genannten Autoren und von mir gefundenen eigentümlichen Verteilung des Zuckers gibt es mehrere Möglichkeiten. So könnte man daran denken, daß vielleicht die Blutkörperchen einen Teil des Zuckers in *gebundenem* Zustande enthalten und dieser Anteil der Bestimmung durch Reduktion entgeht. Da nun *Róna* in seinen berühmt gewordenen Versuchen mittels der Kompensationsdialyse bewiesen hat, daß es außer dem dialysablen keinen Zucker im Blute gibt, kommt diese Möglichkeit nicht in Betracht.

Dann wäre eine Verteilung im Sinne des bekannten *Henryschen* Gesetzes möglich, wenn Plasma und Blutkörpercheninhalt sind, wenn auch beide

<sup>1</sup> Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 71, 314, 1930.

<sup>2</sup> J. of biol. Chem. 78, 117, 1928.

<sup>3</sup> l. c.

wässrige Flüssigkeiten, doch von verschiedener Zusammensetzung und verschiedenem Trockensubstanzgehalt (etwa 10 % im Plasma, und über 30 % in den Blutkörperchen), und diese Unterschiede können eine ungleiche Konzentration des Zuckers in den beiden Medien bedingen. Auch ist es möglich, daß infolge der Oxydationen, die in den Blutkörperchen ebenso wie in den anderen Körperzellen vor sich gehen, fortdauernd Zucker aus ihnen verschwindet, und infolge ihrer — schon von *Fontès* und *Thivolle*<sup>1</sup> betonten — schweren Zuckerpermeabilität nur langsam bzw. immer verspätet vom Plasma her ersetzt wird. Anders im Plasma, aus dem zwar Zucker ebenfalls ständig verschwindet, doch nicht etwa infolge rasch verlaufender Oxydationsvorgänge, sondern infolge des Abflusses gegen die zuckerhungrigen Körperzellen; dieser Zuckerverlust wird aber vom Glykogenlager her rasch und ständig ersetzt. Ist diese Annahme richtig, so handelt es sich (bei ein für allemal gegebener Zuckerpermeabilität der Blutkörperchen) um ein dynamisches Gleichgewicht, dadurch charakterisiert, daß die Zuckerkonzentration in den Blutkörperchen des Menschen und des Hundes stets geringer ist als im Plasma.

b) Verteilung des Zuckers bei Zuckerbelastung.

Durch die vorangehend beschriebenen Versuche ist die Tatsache erwiesen, daß die Blutkörperchen vom Menschen und vom Hund Zucker enthalten, wenn auch weniger als das Plasma; daher sie für Traubenzucker permeabel sein müssen. Über den Grad der Permeabilität sagen sie aber nur wenig aus. Mehr Auskunft war aus nachfolgenden Versuchen zu erhalten, in denen an Hunden die Bestimmungen erst im nüchternen Zustande ausgeführt, sodann in gewissen Zeitabständen nach peroraler Einfuhr von Traubenzucker (50 g in 300 ccm Wasser gelöst) wiederholt wurden. Betrachtet man die in Tabelle III zusammengestellten Daten, so fallen mehrere Momente auf: a) die Zuckerkonzentration ist sowohl in den Blutkörperchen wie auch im Plasma 40 Minuten nach Einbringung des Zuckers beträchtlich *angestiegen*, b) bis zum Ende der Beobachtungsdauer ist sie zwar wieder *abgefallen*, doch steht sie nach diesem Abfall noch immer höher als zu Beginn des Versuchs; c) im Plasma steigt der Zuckergehalt steiler an und erreicht sein Maximum früher als in den Blutkörperchen, so daß in den letzteren ein höherer Wert noch zu einer Zeit bestehen kann, wo der Abfall im Plasma bereits begonnen hat. Als Ausdruck dieser Vorgänge sieht man die V.-Zahl in der ersten nach der Glucoseeinfuhr ausgeführten Bestimmung *unter* den Anfangswert sinken, später aber über jenen Wert, ja über 100 ansteigen, zum Zeichen dessen, daß nun der Zuckergehalt der Blutkörperchen höher ist als der des Plasmas, wie dies auch von *John*<sup>2</sup> am Menschen gefunden wurde, während *Rona* und *Sperling*<sup>1</sup> in ihren an Kaninchen ausgeführten Versuchen dergleichen nur fanden, nachdem sie den Tieren Insulin eingespritzt hatten. Der Umstand, daß die Zuckerkonzentration in den Blutkörperchen langsamer als im Plasma ansteigt, ist nicht anders zu deuten, als daß sie für Zucker *schwer permeabel* sind. Auf dieselbe Weise läßt sich erklären, daß später die Zuckerkonzentration in den Blutkörperchen größer ist als im Plasma. Sobald nämlich der Zufluß des resorbierten Zuckers vom Darm in das Plasma aufhört, ist nicht nur der weiteren Zunahme der Zuckerkonzentration daselbst ein Ende gesetzt, sondern es

<sup>1</sup> l. c.

<sup>2</sup> The J. of laborat. a. Clin. Med. 15, 713, 1930.

Tabelle III.

## Zuckerbelastung an normalen Hunden.

Hund	Zeitpunkt	Zuckerkonzentration in ‰			V-Zahl	Bemerkungen
		im Vollblut	im Plasma	in den Blut- körper- chen		
Róka	Vor Dextrose	0,080	0,116	0,058	50	10. XI. 1931
	40' nach Dextrose	0,126	0,205	0,094	46	35 g Dextrose
	80' „ „	0,104	0,164	0,100	60	KV. = 62 ‰
	Vor Dextrose	0,084	0,110	0,068	62	19. XI. 1931
	40' nach Dextrose	0,103	0,141	0,082	58	50 g Dextrose
	80' „ „	0,100	0,125	0,086	69	KV. = 63 ‰
Farkas	120' „ „	0,102	0,152	0,073	48	
	Vor Dextrose	0,100	0,126	0,080	63	26. I. 1932
	40' nach Dextrose	0,133	0,170	0,104	61	50 g Dextrose
	80' „ „	0,148	0,152	0,146	96	KV. = 56 ‰
	120' „ „	0,106	0,099	0,112	113	
Cigány	180' „ „	0,096	0,093	0,099	106	
	Vor Dextrose	0,088	0,110	0,072	65	3. II. 1932
	40' nach Dextrose	0,124	0,204	0,067	33	50 g Dextrose
	80' „ „	0,140	0,192	0,103	53	KV. = 58 ‰
Bandi	120' „ „	0,108	0,118	0,101	86	
	Vor Dextrose	0,091	0,111	0,072	65	21. II. 1932
	40' nach Dextrose	0,157	0,211	0,106	50	50 g Dextrose
	80' „ „	0,128	0,162	0,096	60	KV. = 51 ‰
	120' „ „	0,134	0,129	0,139	107	
	180' „ „	0,116	0,118	0,114	97	

beginnt sofort ihr Abfall infolge des Abflusses des Zuckers gegen die Gewebe. Dadurch kommt es wohl nur für eine ganz kurze Zeit zu einem Ausgleich der Zuckerkonzentrationen in Plasma und Blutkörperchen (V.-Zahl = 100!). Diesen Zeitpunkt durch Bestimmungen zu erfassen, könnte nur durch einen ganz unwahrscheinlichen Zufall gelingen, denn im nächsten Augenblick machen sich schon die Folgen der schweren Permeabilität der Blutkörperchen geltend. Wären sie nämlich für Zucker leicht permeabel, so würde aus ihnen Zucker mit derselben Geschwindigkeit in das Plasma hinübertreten, wie er aus diesem gegen die Gewebe abströmt; infolge der schweren Permeabilität ist dies aber nicht möglich, was eben zur Folge hat, daß der Blutkörperchenzucker sich einige Zeitlang über dem Niveau des Plasmazuckers erhalten kann.

Von vier an Menschen ganz ähnlich angelegten Versuchen ist einer infolge Analysenfehlers mißglückt; ein zweiter wies ganz und gar unmögliche Werte auf, daher in Tabelle IV nur die Daten von zwei gelungenen Versuchen mitgeteilt sind. Es geht aus ihnen hervor, daß 80 bzw. 120 Minuten nach der Zuckereinfuhr die Zuckerkonzentration in den Blutkörperchen höher war als im Plasma, ganz ähnlich, wie dies auch von *Wiechmann* bezüglich des Menschen beschrieben ist.

Tabelle IV.

## Zuckerbelastung an gesunden Menschen.

Name	Zeitpunkt	Zuckerkonzentration in ‰			V.- Zahl	Bemerkungen
		im Vollblut	im Plasma	in den Blut- körper- chen		
R. Z.	Vor Dextrose	0,104	0,111	0,096	86	17. II. 1931
	40' nach Dextrose	0,137	0,151	0,125	82	50 g Dextrose
	80' „ „	0,117	0,113	0,121	107	KV. = 50 %
	120' „ „	0,107	0,104	0,108	104	
F. P.	Vor Dextrose	0,102	0,112	0,092	82	18. II. 1931
	40' nach Dextrose	0,107	0,128	0,087	68	50 g Dextrose
	80' „ „	0,098	0,098	0,098	100	KV. = 51 %
	120' „ „	0,096	0,094	0,098	104	

Es folgt aus diesen Versuchen nicht nur die Tatsache der *Zuckerpermeabilität der Blutkörperchen, sondern auch, daß sie für Zucker schwerpermeabel sind.* Auf Grund dieser schweren Permeabilität können sonst schwer deutbare Unterschiede im Zuckergehalt vom Plasma und Blutkörperchen erklärt werden.

## c) Verteilung des Zuckers im Blute diabetischer Menschen.

Durch die auch gegenwärtig noch gar nicht geklärten kausalen Beziehungen zwischen dem diabetischen Kohlenhydratstoffwechsel und den Einzelvorgängen im Zelleben wurden mehrere Forscher dazu veranlaßt, die Zuckerverteilung im Blute bei Diabetes zu untersuchen. Auch ich führte solche Versuche aus, und zwar einerseits an ambulanten Diabetikern, die dem Institut zugeschickt wurden, andererseits an Hunden, an denen vorher die Totalexstirpation des Pankreas vorgenommen wurde. Es haben sich hierbei wesentliche Unterschiede zwischen dem Verhalten des Menschen- und Hundeserums ergeben.

Aus den an sieben Männern erhaltenen, in Tabelle V zusammengestellten Ergebnissen geht hervor, daß sich *der Diabetiker bezüglich der Verteilung des Zuckers in seinem Blute vom Gesunden nicht wesentlich unterscheidet*: der Mittelwert der V.-Zahl betrug an Gesunden 76, am Diabetiker beträgt sie 83. Ein Zusammenhang zwischen den recht stark schwankenden Einzelwerten und der Höhe des Blutzuckers ist nicht deutlich nachzuweisen, obzwar es auffallen muß, daß der einzige durch seine Niederheit von den anderen stark abweichende Wert gerade in einem der beiden Versuche vorkommt, in denen die Blutzuckerkonzentration weit höher war als in allen anderen Versuchen. (Hierüber siehe noch weiter unten!) Der Mittelwert, den ich aus *Wiechmanns* an 43 Diabetikern ausgeführten Versuchen berechnet habe, beträgt 77, ist also sehr ähnlich dem von mir an Diabetikern, wie an Gesunden, gefundenen. Wenn *Wiechmann* sagt, daß am Diabetiker die Verteilung eine andere ist als beim Gesunden, so rührt dies davon her, daß er am Gesunden die Zuckerkonzentration — wie ich ausgeführt habe — unrichtigerweise im Blutkörperchen und Plasma des Gesunden gleich groß gefunden hat.

Tabelle V.

## Nüchternwerte an diabetischen Menschen.

Name	Zuckerkonzentration in ‰			V.-Zahl	Bemerkungen
	im Vollblut	im Plasma	in d. Blutkörperchen		
K. L. . . .	0,114	0,119	0,108	90	5. III. 1931; KV. = 44%
L. S. . . .	0,127	0,134	0,117	87	11. III. 1931; KV. = 42%
F. M. . . .	0,143	0,161	0,120	74	12. II. 1931; KV. = 44%
K. J. . . .	0,171	0,182	0,158	87	14. III. 1931; KV. = 46%
S. O. . . .	0,185	0,187	0,182	97	6. III. 1931; KV. = 43%
P. L. . . .	0,263	0,290	0,232	80	5. III. 1931; KV. = 45%
K. E. . . .	0,265	0,305	0,207	68	4. III. 1931; KV. = 41%
	Mittelwert:			<b>83</b>	

## d) Verteilung des Zuckers im Blute pankreasdiabetischer Hunde.

Anders zu beurteilen sind die in Tabelle VI zusammengestellten Ergebnisse der an drei Hunden nach Totalexstirpation des Pankreas ausgeführten Versuche; es waren dies drei von den fünf Hunden, deren Nüchternwerte im gesunden Zustande an der Hand der Tabelle II besprochen wurden. Wie dort erwähnt, betrug in den an den normalen Hunden ausgeführten Versuchen die V.-Zahl im Mittel 65; im pankreaslosen Zustande beträgt sie weniger, bloß 51. Da bei den starken Schwankungen ein Vergleich von Mittelwerten vielleicht als unstatthaft erachtet

Tabelle VI.

## Nüchternwerte an pankreasdiabetischen Hunden.

Hund	Zuckerkonzentration in ‰			V.-Zahl	Bemerkungen
	im Vollblut	im Plasma	in d. Blutkörperchen		
Farkas	0,225	0,365	0,155	42	30. I. 1932; KV. = 67%
	0,257	0,403	0,156	38	2. II. 1932; KV. = 59%
	0,247	0,381	0,151	39	18. II. 1932; KV. = 39%
Cigány	0,267	0,341	0,204	59	14. II. 1932; KV. = 59%
	0,283	0,351	0,221	63	16. II. 1932; KV. = 54%
	0,251	0,326	0,197	60	4. III. 1932; KV. = 58%
	0,282	0,384	0,219	57	5. III. 1932; KV. = 62%
	0,285	0,451	0,124	27*	8. III. 1932; KV. = 54%
Bandi	0,251	0,312	0,204	65	23. III. 1932; KV. = 52%
	0,257	0,379	0,164	43	24. III. 1932; KV. = 57%
	0,254	0,349	0,158	45	25. III. 1932; KV. = 50%
	0,301	0,432	0,153	35**	26. III. 1932; KV. = 47%
	Mittelwert***:			<b>51</b>	

\* 2 oder 3 Tage später verwendet.

\*\* 1 Tag später verwendet.

\*\*\* Ohne die präagonalen Versuche am 8. und 26. III. 1932.

werden kann, sollen auch die an den einzelnen Hunden vor und nach der Pankreasextirpation erhaltenen Werte verglichen werden. Auf diese Weise kommt man zu demselben Ergebnis: an Bandi vorher 78, 65 und 57, nachher 65, 43 und 45; an Farkas vorher 88 und 63, nachher 42, 38 und 39; an Cigány vorher 71 und 65, nachher 59, 63, 60 und 57. (Dabei habe ich bei Bandi und Cigány die ganz niedrigen, im letzten Versuch vor dem Verenden der Tiere erhaltenen Werte nicht angeführt.)

Wodurch diese Verteilung des Zuckers im Blute der pankreasdiabetischen Hunde verursacht wird, soll nachfolgend erörtert werden. Bereits bei der Besprechung der an diabetischen Menschen erhaltenen Ergebnisse habe ich darauf hingewiesen, daß die einzige sehr niedrige V.-Zahl gerade in einem der beiden Versuche vorkam, in denen die Blutzuckerkonzentration weit höher war als in allen anderen Versuchen. In auffallender Übereinstimmung hiermit wiesen im pankreaslosen Zustande alle Hunde, gleichzeitig mit den deutlich herabgesetzten V.-Zahlen, recht hohe Blutzuckerwerte auf. Hieraus könnte man auf das Bestehen eines eigentümlichen Verteilungsgleichgewichts in dem Sinne schließen, daß die Blutkörperchen verhältnismäßig um so weniger Zucker enthalten, je höher der Blutzucker ist, wenn nicht diese Annahme gegen das *Henry'sche* Gesetz verstoßen würde. Mehr Wahrscheinlichkeit hat die folgende Annahme an sich. Die Zuckeraufnahmefähigkeit der Blutkörperchen hat, wie auch *Jacoby* und *Friedel*<sup>1</sup> annehmen, eine bestimmte obere Grenze, die aber von der Zuckeraufnahmefähigkeit des Plasmas weit überschritten wird. Wenn also die mangelhafte Zuckeroxydationsfähigkeit der Körperzellen, die ja als für den Diabetiker charakteristisch angesehen wird, einen gewissen Grad erreicht, kann es dazu kommen, daß der Plasmazucker zu einer Zeit noch ansteigt, wo die Zuckeraufnahmefähigkeit der Blutkörperchen bereits aufgehört hat. Von diesem Zeitpunkt angefangen, muß die V.-Zahl absinken. Daß wenigstens bezüglich des Hundes Cigány eine solche maximale Zuckeraufnahmefähigkeit bestanden hat, soll weiter unten gezeigt werden.

Am ehesten glaube ich aber die verschiedene Verteilung des Zuckers im Blute der von mir untersuchten Diabetiker und meiner pankreaslosen Hunde auf das Pankreas beziehen zu dürfen. Das Pankreas bzw. der Inselapparat der von mir untersuchten Diabetiker muß ja geschädigt gewesen sein, doch läßt sich nicht annehmen, daß sie überhaupt kein intaktes Inselgewebe besessen hätten; wohl ist dies aber bezüglich der Versuchshunde der Fall, an denen ja direkt Sorge dafür getragen ward, daß gar kein Pankreasgewebe zurückbleibe. Dementsprechend verhielten sich auch die von mir untersuchten Diabetiker wie gesunde Menschen, während an den Hunden die Verteilung des Zuckers nach der Entfernung des Pankreas eine andere war als früher, indem die V.-Zahl niedriger geworden ist. *Es muß das Insulin gewesen sein, dessen Mangel diese Änderung bewirkt hat*, wie dies *Wiechmann* auch für die von ihm untersuchten Diabetiker annimmt, und es wird sich weiter unten zeigen müssen, ob sich diese Einwirkung auch experimentell reproduzieren läßt.

e) *Verteilung des Zuckers im Blute pankreasdiabetischer Hunde bei Zuckerbelastung.*

Wie erinnerlich, konnte an normalen Hunden gezeigt werden (siehe Tabelle III), daß nach Zuckerbelastung die Zuckerkonzentration im Plasma

<sup>1</sup> Diese Zeitschr. 244, 365, 1932.

weit rascher ansteigt als in den Blutkörperchen, später aber wieder rascher abfällt, so daß die V.-Zahl nach einer anfänglichen Abnahme später wieder größer wird, ja den Wert über 100 erreichen kann, zum Zeichen dessen, daß nunmehr die Blutkörperchen mehr Zucker enthalten als das Plasma. Die in Tabelle VII zusammengestellten Daten zeigen die Zuckerverteilung

Tabelle VII.  
Zuckerbelastung an pankreasdiabetischen Hunden.

Hund	Zeitpunkt	Zuckerkonzentration in ‰			V-Zahl	Bemerkungen
		im Vollblut	im Plasma	in den Blut- körper- chen		
Farkas	Vor Dextrose	0,225	0,365	0,155	42	30. I. 1932
	45' nach Dextrose	0,264	0,443	0,156	35	50 g Dextrose
	75' " "	0,304	0,496	0,209	42	KV. = 67% <sub>0</sub>
	135' " "	0,295	0,526	0,181	34	
	165' " "	0,290	0,522	0,170	32	
	Vor Dextrose	0,247	0,388	0,151	39	18. II. 1932
	3 <sup>h</sup> nach Dextrose	0,436	0,632	0,302	48	50 g Dextrose
	4 <sup>h</sup> " "	0,407	0,622	0,260	42	KV. = 59%
	6 <sup>h</sup> " "	0,271	0,454	0,146	32	
	Vor Dextrose	0,267	0,341	0,204	59	14. II. 1932
Cigány	3 <sup>h</sup> nach Dextrose	0,336	0,461	0,229	50	50 g Dextrose
	4 <sup>h</sup> " "	0,295	0,427	0,182	43	KV. = 54%
	6 <sup>h</sup> " "	0,276	0,375	0,191	51	
	Vor Dextrose	0,282	0,384	0,219	57	5. III. 1932
	3 <sup>h</sup> nach Dextrose	0,322	0,476	0,227	47	50 g Dextrose
	4 <sup>h</sup> " "	0,285	0,416	0,202	48	KV. = 62%
	Vor Dextrose	0,285	0,451	0,124	27	8. III. 1932
	3 <sup>h</sup> nach Dextrose	0,447	0,632	0,290	46	50 g Dextrose
	4 <sup>h</sup> " "	0,452	0,682	0,263	39	KV. = 54%
	6 <sup>h</sup> " "	0,344	0,519	0,159	31	Am 10. oder 11. III. verendet
Bandi	Vor Dextrose	0,257	0,379	0,164	46	24. III. 1932
	3 <sup>h</sup> nach Dextrose	0,353	0,607	0,161	25	50 g Dextrose
	4 <sup>h</sup> " "	0,328	0,525	0,175	33	KV. = 57%
	6 <sup>h</sup> " "	0,298	0,471	0,167	35	
	Vor Dextrose	0,301	0,432	0,153	35	26. III. 1932
	3 <sup>h</sup> nach Dextrose	0,419	0,634	0,177	28	50 g Dextrose
	4 <sup>h</sup> " "	0,407	0,612	0,176	29	KV. = 47%
	6 <sup>h</sup> " "	0,351	0,492	0,193	39	Am 27. III. verendet.

nach Zuckerbelastung an denselben Hunden, nachdem ihnen das Pankreas entfernt wurde. In dem am Hund Farkas am 30. Januar ausgeführten Versuch wurde erst der Nüchternwert festgestellt, dann Zucker gegeben, und nun folgten die Bestimmungen einander in denselben kurzen Zeiträumen wie in den früher besprochenen Versuchen und waren nach 165 Minuten



abgeschlossen. Wie in den früheren Versuchen an den nicht operierten Tieren, war auch hier die Zuckerkonzentration im Plasma rascher als in den Blutkörperchen angestiegen, demzufolge die V.-Zahl abfiel; hingegen fehlte bis zu dem nach 165 Minuten erfolgten Abschluß der Versuche der *Wiederanstieg* jener Zahl, durch die am nicht operierten Tiere angezeigt wurde, daß der Zucker aus dem Plasma rascher gegen die Gewebe abströmt, als er aus den Blutkörperchen (durch Verbrennung, durch Übertritt in das Plasma?) verschwindet. In der Annahme, daß an pankreasdiabetischen Tieren dieser Wiederanstieg vielleicht später erfolgt, habe ich in den weiteren Versuchen die erste Bestimmung 3 Stunden nach der Zuckereinfuhr, die nächsten aber um weitere 1 bis 2 Stunden später ausgeführt. Von dem am 26. März am Hund Bandi, am 8. März am Hund Cigány ausgeführten Versuch soll, da die Tiere 1 Tag bzw. wenige Tage später verendeten, abgesehen werden. In den anderen Versuchen ist nicht zu verkennen, daß a) der Abfall der V.-Zahl oft noch in der dritten oder vierten Stunde nach der Zuckereinfuhr wahrzunehmen ist, b) der Wiederanstieg aber auch in der sechsten Stunde noch sehr gering ist oder überhaupt fehlt.

Was die Ursache jenes Abfalles anbelangt, muß die Konstanz der Blutkörperchenzuckerwerte in manchen Versuchen (so am 24. März am Hund Bandi, am 14. Februar und noch mehr am 5. März am Hund Cigány) auffallen. Offenbar konnte in diesem Versuch die Zuckerkonzentration in den Blutkörperchen, da sie bereits *vor der Zuckereinfuhr ihr Maximum erreicht hat*, nach der Zuckereinfuhr nicht weiter ansteigen, während der Plasmazucker infolge der Zuckereinfuhr eine weitere erhebliche Zunahme, daher die V.-Zahl eine erhebliche *Abnahme* erfuhr. (Es sind dies dieselben beiden Hunde, von denen bereits im Abschnitt d) als Ursache der auffallend konstanten Werte im pankreaslosen, doch nüchternen Zustande dasselbe vermutet wurde.) Daß sich Hund Farkas anders verhält, ist nicht zu verwundern, wenn man bedenkt, welch mannigfache und komplizierte Vorgänge neben den hier in Frage stehenden einherlaufen, und welche Summe von Versuchsfehlern unterkommen kann, so daß man eigentlich staunen muß, mit welcher Klarheit die Erscheinungen an den beiden anderen Hunden an den Tag treten.

Das zweite auffallende Moment ist, daß der Wiederanstieg der V.-Zahl hier sehr mangelhaft ist, oder überhaupt ausbleibt, während sie doch in den Zuckerbelastungsversuchen an nichtoperierten Hunden (s. Tabelle III) den Wert 100 oft erreicht oder gar überschritten hat. Dieses verschiedene Verhalten der pankreaslosen Hunde ist aber leicht zu erklären. Infolge der mangelhaften Zuckeroxydationsfähigkeit der Körperzellen geht nämlich der Abfluß des Zuckers aus dem Plasma, in das es infolge der Belastung gelangte, nur sehr langsam vonstatten, so daß auch nach 6 Stunden, als die Versuche abgeschlossen wurden, die Zuckerkonzentration daselbst zum mindesten noch doppelt so groß war als in den Blutkörperchen.

f) *Die Zuckerverteilung im Blute normaler Hunde nach Insulineinspritzung.*

Es wurde unter d) die Möglichkeit betont, daß die eigentümliche Art der Zuckerverteilung im Blute der pankreaslosen Hunde durch die Abwesenheit des Inselapparates bzw. Mangel von Insulin bedingt sein könnte. Um dies zu entscheiden, mußte die Einwirkung des Insulins auf normale, im Besitz ihres Pankreas befindliche Hunde geprüft werden. (Diese Versuche gingen den unter d) und e) besprochenen zeitlich voran und wurden an denselben

Tabelle VIII.

## Insulinversuche an normalen Hunden.

Hund	Zeitpunkt	Zuckerkonzentration in ‰			V.-Zahl	Bemerkungen
		im Vollblut	im Plasma	in den Blut- körper- chen		
Róka	Vor Insulin	0,105	0,117	0,098	84	31. XII. 1931
	30' nach Insulin	0,079	0,125	0,051	40	20. E. Insulin
	150' „ „	0,093	0,102	0,088	86	KV. = 62 %
	Vor Insulin	0,101	0,137	0,082	60	5. I. 1932
	45' nach Insulin	0,043	0,115	0,005?	4?	40 E. Insulin
	135' „ „	0,039	0,056	0 031	55	KV. = 66 %
	Vor Insulin	0,114	0,134	0,100	75	8. I. 1932
	45' nach Insulin	0,057	0,084	0,027	32	40 E. Insulin
	135' „ „	0,049	0,058	0,043	74	KV. = 60 %
165' „ „	0,056	0,074	0,044	59		
Farkas	Vor Insulin	0,093	0,101	0,088	88	19. I. 1932
	45' nach Insulin	0,058	0,082	0,043	52	40 E. Insulin
	135' „ „	0,047	0,050	0,045	90	KV. = 62 %
	165' „ „	0,055	0,063	0,050	79	
Cigány	Vor Insulin	0,108	0,130	0,092	71	1. II. 1932
	45' nach Insulin	0,090	0,127	0,064	50	40 E. Insulin
	135' „ „	0,067	0,076	0,061	80	KV. = 58 %
	165' „ „	0,092	0,109	0,080	73	
Bandi	Vor Insulin	0,110	0,123	0,096	78	14. I. 1932
	45' nach Insulin	0,080	0,120	0,037	31	40 E. Insulin
	135' „ „	0,059	0,080	0,037	46	KV. = 48 %
	165' „ „	0,073	0,081	0,064	79	

Hunden ausgeführt, denen später das Pankreas entfernt wurde.) Nachdem an den hungernden Tieren die Zuckerkonzentration im Vollblut und im Plasma festgestellt wurde, habe ich den Tieren 40 Einh. Insulin „Richter“ (in einem Versuch bloß 20 Einh.) beigebracht. Binnen 45 Minuten trat, wie aus Tabelle VIII ersichtlich, jedesmal eine bedeutende Verringerung der V.-Zahl ein, und zwar wurde diese Verringerung dadurch bewirkt, daß der Blutkörperchenzucker weit stärker als der Plasmazucker abgefallen ist. Wenn aber nach etwa  $1\frac{1}{2}$  oder  $2\frac{3}{4}$  Stunden die V.-Zahl angenähert wieder zu ihrem ursprünglichen Wert zurückgekehrt ist, so rührt dies davon her, daß zu dieser Zeit der Blutkörperchenzucker bereits wieder angestiegen ist (allerdings ohne noch seinen ursprünglichen Wert erlangt zu haben), während der Plasmazucker oft noch in weiterer Abnahme begriffen war. (In *Rona* und *Sperlings*<sup>1</sup> fünf Kaninchenversuchen war die V.-Zahl — wie ich sie aus den Originaldaten berechnet habe — binnen 2 Stunden weit über 100 gestiegen; es scheint, daß diesbezüglich die an

<sup>1</sup> l. c.

Hunden und an Kaninchen ausgeführten Versuche miteinander nicht verglichen werden können.) Daß die Zuckerkonzentration im Plasma abfällt, ist begreiflich; nimmt man doch allgemein an, daß nach Einbringung entsprechender Insulinmengen Zucker in verschiedenen Körperzellen zu Glykogen polymerisiert und abgelagert wird, dies aber einen merklichen Zuckerabfluß aus dem Plasma bedingen muß. Doch ergeben sich folgende zwei Fragen: warum sinkt der Zuckergehalt der Blutkörperchen in der ersten Phase der Insulineinwirkung so stark, und zwar um so vieles stärker als im Plasma ab? Warum steigt er später wieder an?

Die Abnahme des Zuckergehaltes der Blutkörperchen in der ersten Phase läßt sich auf Grund einer etwa geänderten Permeabilität nicht erklären, ebensowenig auf Grund von Diffusionsvorgängen, denn die Zuckerkonzentration in den Blutkörperchen ist ja von Anfang her geringer als im umgebenden Plasma, und der Zucker wird doch nicht vom Orte der kleineren Konzentration gegen den der höheren strömen! Eine plausible Erklärung der Abnahme des Blutkörperchenzuckers in dieser ersten Phase der Insulinwirkung wäre, daß infolge der Insulinwirkung der Zucker in den Blutkörperchen, wie in anderen zelligen Elementen entweder in erhöhtem Maße verbrannt, oder aber zu Glykogen polymerisiert wird, demzufolge er der Bestimmung mittels der Reduktionsverfahren entgeht. Warum aber letzterer Vorgang in den Blutkörperchen und nicht, oder nicht in gleichem Maße, im Plasma vor sich geht, läßt sich leicht beantworten, wenn man den genannten Polymerisierungsvorgang als eine Funktion der Zellen allein in dem Sinne auffaßt, daß sein richtiger Ablauf an die Anwesenheit gewisser, bloß in den Zellen enthaltener Enzyme, oder anderer Zellbestandteile, oder an die komplizierte, wenn auch uns unbekannte, Zellstruktur usw. gebunden ist.

Die zweite Phase, der Wiederanstieg der Zuckerkonzentration in den Blutkörperchen und damit auch die Zunahme der V.-Zahl, läßt sich einfach auf das Abklingen der Insulinwirkung zurückführen, demzufolge vielleicht eine Rückverzuckerung des Glykogens erfolgt; daneben lassen sich auch Diffusionsvorgänge annehmen, indem der Zucker aus dem Plasma mit dem größeren, wenn auch abnehmenden Zuckergehalt, in die sehr zuckerarm gewordenen Blutkörperchen abströmt. Sehr bemerkenswert ist, daß die V.-Zahl in den meisten Versuchen zum Schluß angenähert genau zu dem Werte angestiegen ist, den sie vor der Insulineinspritzung hatte, dabei aber die Zuckerkonzentration sowohl im Plasma, wie auch in den Blutkörperchen noch lange nicht zu ihren Anfangswerten zurückgekehrt sind. Mehr als irgendein anderer zeigt dieser Umstand, daß die Verteilung des Zuckers zwischen Plasma und Blutkörperchen strengen Gesetzmäßigkeiten unterworfen, und nicht etwa ein Zufallsbefund ist.

*g) Verteilung des Zuckers im Blute pankreasdiabetischer Hunde nach Insulineinspritzung.*

Wie unter d) ausgeführt wurde, unterscheiden sich bezüglich der Zucker-Verteilung zwischen Plasma und Blutkörperchen pankreasdiabetische Hunde von normalen Hunden darin, daß am operierten Tiere die Blutkörperchen verhältnismäßig noch weniger Zucker enthalten als an den nicht operierten, wie dies auch aus den V.-Zahlen hervorgeht. Als ich nun den pankreaslosen Hunden Insulin in denselben Mengen beigebracht habe, wie sie vor der Pankreasexstirpation erhielten, war zunächst, wie aus den Daten der Tabelle IX hervorgeht, auch hier zu konstatieren, daß der Zucker-

gehalt der Blutkörperchen stärker als der des Plasmas abnahm, demzufolge die V.-Zahl abfiel. Auch hier fand später ein Wiederanstieg der V.-Zahl statt, dadurch veranlaßt, daß der Zuckergehalt der Blutkörperchen jetzt stärker angestiegen ist als der Plasmazucker. (Von den zahlreichen Versuchen von *Wiechmann* an Diabetikern lassen sich nur die am Patienten M. am 5. Januar und am Patienten Sch. am 21. November ausgeführten je drei Versuche vergleichen, während in allen anderen Fällen bloß je ein Versuch an einem Tage ausgeführt wurde. In den genannten Versuchen ist nur der Anstieg der V.-Zahl, nicht aber auch der vorangehende Abfall, wie in meinen Versuchen, zu sehen.) Doch besteht zwischen den an nicht operierten und an pankreaslosen Hunden ausgeführten Versuchen der wichtige Unterschied, daß an den ersteren Hunden die V.-Zahl einfach zu ihrem Ausgangswert zurückkehrte, den sie vor der Insulingabe hatte, an *den pankreaslosen aber über den niedrigen Anfangswert hinauswuchs und Werte erreichte, die dem nicht operierten Tiere eigentümlich sind*, wie dies aus der Tabelle X ersehen werden kann.

Tabelle IX.

## Insulinversuche an pankreasdiabetischen Hunden.

Hund	Zeitpunkt	Zuckerkonzentration in ‰			V.- Zahl	Bemerkungen
		im Vollblut	im Plasma	in den Blut- körper- chen		
Farkas	Vor Insulin	0,257	0,403	0,156	38	2. II. 1932
	45' nach Insulin	0,232	0,360	0,144	40	40 E. Insulin
	135' " "	0,177	0,205	0,158	77	KV. = 59 %
	165' " "	0,142	0,164	0,127	77	
Cigány	Vor Insulin	0,283	0,351	0,221	63	16. II. 1932
	45' nach Insulin	0,259	0,343	0,187	54	40 E. Insulin
	135' " "	0,217	0,308	0,140	45	KV. = 54 %
	165' " "	0,182	0,202	0,165	81	
	Vor Insulin	0,251	0,326	0,197	60	4. III. 1932
	45' nach Insulin	0,224	0,322	0,153	47	40 E. Insulin
	135' " "	0,213	0,275	0,168	61	KV. = 58 %
	165' " "	0,203	0,220	0,191	87	
Bandi	Vor Insulin	0,256	0,312	0,204	65	23. III. 1932
	45' nach Insulin	0,210	0,298	0,129	43	40 E. Insulin
	135' " "	0,193	0,225	0,163	72	KV. = 52 %
	165' " "	0,248	0,252	0,244	97	
	Vor Insulin	0,254	0,349	0,158	45	25. III. 1932
	45' nach Insulin	0,239	0,337	0,140	41	40 E. Insulin
	135' " "	0,223	0,257	0,193	75	KV. = 50 %
	165' " "	0,239	0,317	0,160	50	

Die Deutung dieser Erscheinungen fällt nicht schwer. Wie an den nicht operierten Hunden, läßt sich auch betreffs der pankreaslosen der anfängliche Abfall der V.-Zahl vielleicht durch eine Polymerisierung des Blutkörperchenzuckers zu Glykogen, ihr späterer Anstieg aber durch eine

Wiederverzuckerung des Glykogens beim Abklingen dieser Insulinwirkung erklären. Der Umstand jedoch, daß an den pankreaslosen Hunden die V.-Zahl schließlich Werte erlangt, die sonst nur an normalen, nicht operierten Hunden vorkommen ist dahin zu deuten, daß *pankreaslose, daher Insulin entbehrende Hunde, wenn ihnen Insulin beigebracht wird, sich für die Dauer der Insulinwirkung nicht von normalen, nicht operierten Hunden unterscheiden.*

Tabelle X.

V.-Zahlen.

Hund	Im normalen Zustande		Im pankreaslosem Zustande	
	Vor Insulin	Letzter Wert nach Insulin	Vor Insulin	Letzter Wert nach Insulin
Farkas . . . . .	88	79	38	77
Cigány . . . . .	71	73	63	81
			60	87
Bandi . . . . .	78	79	65	97
			45	50

### III. Schlußfolgerungen.

Aus den Ergebnissen der oben geschilderten Versuche lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Die Blutkörperchen im Blute des Menschen und des Hundes enthalten sicher weniger Zucker als das Plasma.

2. Wird Hunden Zucker per os eingeführt, so enthalten bei zunehmendem Zuckergehalt des Gesamtblutes die Blutkörperchen zunächst verhältnismäßig noch weniger Zucker; doch kehrt sich dieses Verhältnis später um, so daß die Blutkörperchen sogar mehr Zucker als das Plasma enthalten können. Ähnliches ist auch betreffs des Menschen der Fall.

3. Im Blute von Menschen mit nicht schwerem Diabetes ist die Verteilung des Zuckers nicht anders als im Blute Gesunder.

4. Im Blute pankreasloser Hunde enthalten die Blutkörperchen im Verhältnis zum Plasma noch weniger Zucker als in dem vom normalen Hunde, woraus auf eine Rolle des Pankreas bzw. des vom Pankreas gelieferten Insulins in der Verteilung des Zuckers gefolgert werden kann.

5. Wird pankreaslosen Hunden Zucker zugeführt, so nimmt das Mißverhältnis in der Verteilung des Zuckers zuungunsten der Blutkörperchen zu, wie an normalen Hunden; doch ist die Umkehr des Verhältnisses zwischen Blutkörperchen- und Plasmazucker im Gegensatz zu den normalen Hunden oft unvollkommen oder fehlt, offenbar weil der Zuckerabfluß aus dem Plasma gegen die Gewebe ein mangelhafter ist.

6. Wird normalen Hunden Insulin eingespritzt, so nimmt der Zuckergehalt der Blutkörperchen vielleicht infolge der Polymerisierung

des Zuckers zu Glykogen stark ab; infolge der etwaigen Wiederverzuckerung stellt sich die frühere Verteilung des Zuckers wieder ein.

7. Daraus, daß die von der Norm abweichende Verteilung des Zuckers im Blute pankreasloser Hunde durch eine entsprechende Insulingabe nach einiger Zeit derart geändert wird, daß diese Verteilung nunmehr der Norm nahekommt, folgt mit großer Wahrscheinlichkeit, daß die Zuckerverteilung im Blute des normalen Organismus dem in ihm zirkulierenden Insulin zu verdanken ist, indem die Blutkörperchen des normalen Organismus aus irgendeinem Grunde, z. B. infolge der Zusammensetzung ihrer äußeren Schichten, für Zucker an und für sich sehr schwer permeabel sind; und in dem Grade permeabel, wie man es im Versuch findet, erst durch das Insulin werden, das durch das Pankreas in den Kreislauf geworfen wird.

Auf welche Weise das Insulin hierbei wirksam sein könnte, soll an dieser Stelle nicht erörtert werden.

Unmittelbar vor Absendung des Manuskriptes obiger Arbeit erhielt ich Kenntnis von *Mac Kays*<sup>1</sup> Versuchen, aus denen hervorgeht, daß die Zuckerkonzentration in den Blutkörperchen und im Blutplasma der von ihm untersuchten gesunden und kranken Menschen sich etwa verhält wie 75 : 100 (wie auch frühere Autoren und auch ich gefunden haben), hingegen wie 100 : 100, wenn man die Konzentration auf das Plasmawasser bzw. Blutkörperchenwasser allein bezieht. Sieht man davon ab, daß diese Art der Konzentrationsberechnung nicht allgemein üblich ist, und sieht auch davon ab, daß im Falle der auf obige Weise gedachten Gleichheit der Konzentrationen bezüglich so mancher Umstände (z. B. bezüglich der zu erwartenden osmotischen Erscheinungen bzw. des Bestehens eines Konzentrationsgefälles) keineswegs alles sichergestellt ist, muß zugegeben werden, daß *Mac Kays* überraschender Schluß mit aller Deutlichkeit aus seinen Versuchsergebnissen hervorgeht, und, allerdings mit obigem Vorbehalt, jeden weiteren Erklärungsversuch der Zuckerverteilung im Blute des nüchternen normalen Organismus überflüssig macht. Anders unter den weiter oben ausführlich erörterten Umständen, wie Zuckerbelastung oder Insulineinspritzung! Diesbezüglich sollen nur zwei Beispiele angeführt werden. Wenn am Hund Bandi am 21. Februar im Plasma 0,129, in den Blutkörperchen aber 0,139 % Zucker gefunden wird, so könnte dieselbe Zuckerkonzentration im Plasmawasser und Blutkörperchenwasser, nach *Mac Kay* berechnet, nur bestehen, wenn letztere mehr Wasser als das Plasma, also mehr als etwa 90 Vol.-% Wasser enthalten

<sup>1</sup> *E. M. Mac Kay*, J. of biol. Chem. **97**, 685, 1932.

hätten, was ja natürlich ganz unwahrscheinlich ist. Umgekehrt hätte am selben Hund am 14. Januar, als ich in seinem Plasma 0,120, in seinen Blutkörperchen aber bloß 0,037 % Zucker fand, ein undenkbar starker Wasseraustritt aus den Blutkörperchen stattgefunden haben müssen, damit die Zuckerkonzentration im Plasmawasser und im Blutkörperchenwasser gleiche Werte aufweist.

Andererseits habe ich in mehreren Versuchen gefunden, daß das Volumen und damit aller Wahrscheinlichkeit nach der Wassergehalt der Blutkörperchen im Verlauf eines stundenlang währenden Versuchs bloß Schwankungen aufweist, die 5 % kaum erreichen und sicherlich Versuchsfehlern zuzuschreiben sind, wo doch während derselben Zeit die Blutkörperchenzuckerkonzentration auf das Doppelte ansteigen oder auf die Hälfte absinken kann.

---





## Über die Lichtabsorption des Kohlenoxydhämoglobins.

Von

Vilma Sebesta.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der kgl. ung. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 18. Februar 1933.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Es ist seit längerer Zeit bekannt, daß das Absorptionsspektrum des CO-Hämoglobins dem des Oxyhämoglobins äußerst ähnlich ist, und daß die beiden Absorptionsstreifen des CO-Hämoglobins gegen die des Oxyhämoglobins bloß ein wenig gegen das blaue Ende des Spektrums verschoben sind. Seit den Untersuchungen von *Hüfner* ist es auch bekannt, daß trotz der soeben erwähnten Ähnlichkeit der Spektren ein bedeutender Unterschied zwischen den beiden Hämoglobingverbindungen bezüglich der Stärke ihrer Lichtabsorption an gewissen Spektralstellen bestehen muß, denn das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten an den beiden von *Hüfner* zu diesem Behufe verwendeten Spektralstellen beträgt am Oxyhämoglobin 1,58, am CO-Hämoglobin aber 1,10. Aus diesen und anderen Gründen erschien es wünschenswert, die Lichtabsorption des CO-Hämoglobins längs des sichtbaren Spektrums zu bestimmen. Solche Bestimmungen wurden vor einigen Jahren von *Haurowitz*<sup>1</sup> veröffentlicht, und es soll weiter unten besprochen werden, inwieweit meine Befunde von den seinigen abweichen.

### Versuchsmethodik.

Großes Gewicht habe ich auf möglichste Reinheit der zu untersuchenden Präparate gelegt.

a) Aus Pferdeblut wurde kristallisiertes Oxyhämoglobin nach der Vorschrift von *Willstätter* und *Pollinger* bereitet, der Kristallkuchen in 37°igem Wasser gelöst, und in die filtrierte Lösung reines Kohlenoxyd unter öfterem Umrühren 40 Minuten hindurch eingeleitet. (Das Kohlenoxyd

<sup>1</sup> Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem. 151, 133, 1926.

wurde bereitet, indem ich eine 80 %ige Lösung von Ameisensäure in konzentrierte Schwefelsäure langsam eintropfen und das entweichende Gas durch destilliertes Wasser und dann erst durch die Farbstofflösung perlen ließ.) Nun wurde die Lösung abgekühlt und mit  $\frac{1}{5}$  Volumen stark gekühltem Alkohol versetzt, zur Verhinderung der Reoxydation mit einer Schicht Paraffinöl bedeckt und in ein Kältegemisch eingelegt. Das nach 24 Stunden auskristallisierte Kohlenoxydhämoglobin wurde abgenutscht, in 37%igem Wasser gelöst, durch die Lösung wieder Kohlenoxyd  $\frac{1}{4}$  Stunde lang geleitet und dieser Vorgang noch einmal wiederholt. Eine genau gewogene Menge des Kristallkuchens, von dem zwei bis drei Proben zur Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes entnommen worden waren, habe ich in 100 ccm Wasser gelöst und diese Lösung der spektrophotometrischen Bestimmung zugeführt, unmittelbar vorher aber noch einmal Kohlenoxyd durchgeleitet.

b) Bei der Darstellung des CO-Hämoglobins aus Rinderblut mußte infolge seiner leichteren Löslichkeit etwas anders vorgegangen werden. So mußte die Lösung mit  $\frac{1}{3}$  Volumen Alkohol versetzt und außerdem von dem wiederholten Umkristallisieren abgesehen werden. (Bemerkt sei, daß das Kohlenoxydhämoglobin aus Pferdeblut entschieden schwerer wasserlöslich ist als Oxyhämoglobin, während bezüglich der Präparate aus Rinderblut kein solcher Unterschied besteht.) Dementsprechend erfolgte die Sättigung mit Kohlenoxyd nur zweimal, während dies an den Präparaten aus Pferdeblut viermal der Fall war.

Die Konzentration der der spektrophotometrischen Untersuchung zugeführten Lösung wurde auf Grund des Trockensubstanzgehaltes des Kristallkuchens berechnet. Zu diesem Behufe wurden die oben erwähnten zwei bis drei genau gewogenen Proben des gut verrührten Kristallbreies bei niedriger Temperatur getrocknet, hierauf lufttrocken wieder gewogen, fein pulverisiert und schließlich im Glycerintrockenschrank bei  $106^{\circ}$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die spektrophotometrischen Bestimmungen wurden mittels eines nach *Martens* und *Grünbaum* modifizierten *Königschen* Spektrophotometers längs eines großen Teiles des sichtbaren Spektrums ausgeführt. Als Lichtquelle diente eine Metallfadenglühlampe; der Objektivspalt war auf 0,1 mm Breite eingestellt, der Okularspalt umfaßte jeweils einen Spektralbereich, dessen Breite im Rot etwa 15  $\mu\mu$ , im Blau 5  $\mu\mu$  betrug.

#### Versuchsergebnisse.

Die erhaltenen Extinktionskoeffizienten wurden auf eine 0,1 %ige Lösung umgerechnet und in die Tabelle als „spezifische Extinktionskoeffizienten“ eingetragen, und zwar sowohl bezüglich der Pferde-, wie auch der Rinderpräparate. In derselben Tabelle sind auch die Mittelwerte berechnet, aus deren Vergleich sich ein stellenweise nennenswerter Unterschied zwischen Pferde- und Rinderkohlenoxydhämoglobin ergibt. Da mir aus Pferdeblut doppelt soviel Präparate zur Verfügung standen als aus Rinderblut und, wie erwähnt, das Rinderkohlenoxydhämoglobin nicht umkristallisiert wurde, und die an Rinderpräparaten erhaltenen Werte auch untereinander weniger gut übereinstimmten, können die vom Pferde erhaltenen Mittelwerte als die richtigeren

Mitte des Spektralausschnittes μμ	Pferd					Rind			Mittelwert	
	Präparat					Präparat				
	I	II	III	IV	V	VI	I	II		III
593,4	0,114	0,106	0,133	0,119	0,108	0,116	0,106	0,107	0,094	0,106
585,0	—	—	—	—	—	—	0,115*	—	—	—
576,6	—	—	—	—	—	—	0,235*	—	—	—
573,5	0,661	0,602	0,636	0,634	0,622	0,629	0,636	0,608	0,628	0,625
570,5	0,695	0,693	0,734	0,728	0,701	0,712	0,710	0,701	0,730	0,721
569,0	0,719	0,721	0,761	0,761	0,722	0,744	0,736	0,732	0,758	0,753
568,2	0,727	0,730	0,781	0,771	0,740	0,754	0,750	0,745	0,770	0,766
567,5	0,729	0,738	0,782	0,770	0,737	0,754	0,751	0,751	0,770	0,770
566,8	0,736	0,743	0,784	0,776	0,741	0,762	0,757	0,753	0,782	0,773
566,0	0,739	0,740	0,789	0,774	0,754	0,768	0,757	0,749	0,788	0,774
564,7	0,735	0,736	0,785	0,768	0,757	0,753	0,756	0,750	0,780	0,773
563,3	0,744	0,747	0,773	0,774	0,754	0,748	0,757	0,751	0,770	0,762
560,8	0,691	0,691	0,713	0,719	0,698	0,692	0,700	0,708	0,725	0,718
556,6	0,642	0,642	0,659	0,678	0,642	0,649	0,658	0,682	0,679	0,673
555,4	0,630	0,639	0,667	0,661	0,633	0,633	0,644	0,647	0,661	0,659
554,2	0,625	0,630	0,663	0,652	0,633	0,625	0,636	0,636	0,668	0,652
551,7	0,622	0,626	0,653	0,653	0,620	0,623	0,633	0,650	0,656	0,647
549,2	0,624	0,633	0,666	0,650	0,630	0,637	0,640	0,668	0,662	0,659
547,0	0,642	0,653	0,686	0,679	0,645	0,664	0,661	0,664	0,691	0,678
544,7	0,685	0,686	0,710	0,707	0,671	0,677	0,689	0,735	0,736	0,725
542,5	0,715	0,719	0,751	0,743	0,715	0,728	0,728	0,762	0,770	0,755
540,2	0,744	0,739	0,791	0,772	0,751	0,752	0,758	0,734	0,792	0,789
539,5	0,758	0,763	0,790	0,767	0,762	0,763	0,767	0,796	0,802	0,791
539,0	0,758	0,765	0,792	0,772	0,758	0,761	0,768	0,810	0,807	0,796
538,5	0,773	0,763	0,793	0,771	0,764	0,773	0,770	0,799	0,814	0,797
538,0	0,773	0,768	0,802	0,778	0,764	0,777	0,777	0,825	0,811	0,807
537,4	0,767	0,774	0,800	0,764	0,759	0,770	0,772	0,816	0,818	0,807
536,9	0,770	0,770	0,790	0,770	0,777	0,775	0,776	0,805	0,835	0,811
536,4	0,773	0,764	0,797	0,777	0,768	0,781	0,777	0,816	0,815	0,808
535,9	0,754	0,768	0,795	0,768	0,771	0,781	0,773	0,820	0,823	0,813
534,8	0,764	0,754	0,791	0,772	0,750	0,781	0,769	0,810	0,815	0,802
532,8	0,745	0,738	0,776	0,749	0,734	0,747	0,741	0,776	0,790	0,775
527,7	0,651	0,645	0,686	0,666	0,645	0,668	0,660	0,689	0,688	0,680
518,1	0,451	0,533?	0,491	0,474	0,453	0,474	0,479	0,462	0,461	0,457
509,2	0,352	0,346	0,384	0,381	0,355	0,375	0,362	0,359	0,332	0,338

\* An dieser Spektralstelle wurde die Bestimmung an einem Präparat VII vorgenommen.

angesehen werden. Diese Mittelwerte sind es, die ich als Ordinaten in ein Koordinatensystem eintrug, auf dessen Abszissenachse die Wellenlängen verzeichnet sind (Abb. 1). Zu Vergleichszwecken habe ich

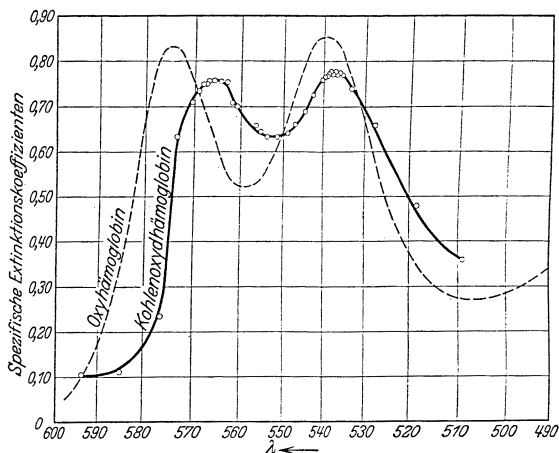


Abb. 1.

dasselbst auch die von *Hári*<sup>1</sup> gefundene Absorptionskurve des Oxyhämoglobins eingezeichnet. Aus der Betrachtung dieser graphischen Darstellungen der Lichtabsorptionskurven des Kohlenoxydhämoglobins und Oxyhämoglobins ergibt sich in Übereinstimmung auch mit den bekannten spektrographischen Aufnahmen von *Rost, Franz* und *Heise*<sup>2</sup> eine geringe Verschiebung der beiden Absorptionsmaxima des CO-Hämoglobins nach Violett, wobei das rotwärts gelegene bedeutend stärker verschoben ist, demzufolge die beiden Maxima näher aneinander zu liegen kommen als die des Oxyhämoglobins. Abweichend hiervon ist bei *Hawrowitz* das erste Absorptionsmaximum des Kohlenoxydhämoglobins gegenüber dem des Oxyhämoglobins zwar ebenfalls violettwärts, das zweite aber rotwärts verschoben. An den Stellen dieser beiden Maxima ist die Lichtabsorption des CO-Hämoglobins, wie aus der Abbildung hervorgeht, geringer als die des Oxyhämoglobins, hingegen an der dazwischen liegenden Stelle des fälschlich sogenannten Minimums deutlich stärker. Bei *Hawrowitz* sind umgekehrt an den Stellen der beiden Maxima die Extinktionskoeffizienten beim Kohlenoxydhämoglobin deutlich größer als die des Oxyhämoglobins. Bezüglich der beiden Maxima und des Minimums ist noch zu erwähnen, daß sie je eine recht flache Kuppe darstellen und es sehr schwer fällt, je einen

<sup>1</sup> Diese Zeitschr. 82, 244, 1917.

<sup>2</sup> *Rost, Franz* u. *Heise*, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 32, 1909.

Punkt in der Mitte der Kuppen als den der maximalen bzw. der minimalen Absorption zu bezeichnen. Mit dieser Einschränkung fand ich die Maxima bei 566,0 und 537,5, das Minimum bei 551,0  $\mu\mu$ .

In der Literatur werden für die Lage der beiden Maxima folgende Wellenlängen angegeben:

von Hoppe-Seyler <sup>1</sup> . . . . .	572	und	536 $\mu\mu$
„ Jäderholm <sup>2</sup> . . . . .	569	„	534 $\mu\mu$
„ Lewin, Miethé u. Stenger <sup>3</sup> . . . . .	570	„	542 $\mu\mu$
„ Hagenbach u. Strub <sup>4</sup> . . . . .	567,5	„	538 $\mu\mu$
„ Formánek <sup>5</sup> . . . . .	571	„	537,5 $\mu\mu$
„ Haurowitz <sup>6</sup> . . . . .	570,5	„	544 bzw. 540 $\mu\mu$ <sup>7</sup>

Aus den in der Tabelle mitgeteilten Daten ließen sich noch folgende Werte berechnen:

a) Hüfner hatte, wie bekannt, vorgeschlagen, aus den Extinktionskoeffizienten an den Spektralstellen 537,4 und 560,8  $\mu\mu$  einen Quotienten zu berechnen, der für je eine Modifikation des Blutfarbstoffs charakteristisch ist. Dieser Quotient hat im Falle des Kohlenoxydhämoglobins, aus meinen Daten berechnet, den Wert 1,10, wie auch Hüfner selbst gefunden hat.

b) Berechnet man aus den an den beiden genannten Spektralstellen von mir gefundenen Extinktionskoeffizienten das sogenannte Absorptionsverhältnis (*Vierordt*), so erhält man für die Stelle 537,4 den Wert 0,00130 (nach Hüfner 0,00126), für die Stelle 560,8  $\mu\mu$  aber den Wert 0,00143 (nach Hüfner 0,00130).

Mit Hilfe dieser beiden Zahlen läßt sich in einer Kohlenoxydhämoglobinlösung von unbekannter Konzentration diese auf Grund des bekannten Prinzips berechnen.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. Hári ausgeführt.

<sup>1</sup> F. Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chem. **13**, 496, 1889; zit. nach Hoppe-Seyler-Thierfelders Handb. d. physiol. u. pathol.-chem. Analyse, 12. Aufl., 1924, S. 527.

<sup>2</sup> A. Jäderholm, Nordisk. medicinsk Archiv **6**, Nr. 11 u. 21; zit. nach Jahresber. f. Tierchem. **4**, 102, 1874.

<sup>3</sup> L. Lewin, A. Miethé u. E. Stenger, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **118**, 80, 1907.

<sup>4</sup> A. Hagenbach u. J. Strub, Arch. de la soc. phys. et nat. **7**, 222, 1925; zit. nach Ber. ü. d. ges. Phys. u. exper. Pharm. **37**, 133, 1926.

<sup>5</sup> J. Formánek, Zeitschr. f. anal. Chem. **40**, 501, 1901; zit. nach Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. **6**, 118, 1928.

<sup>6</sup> F. Haurowitz, Zeitschr. f. physiol. Chem. **151**, 133, 1926.

<sup>7</sup> Versuche mit reinem CO bzw. mit gereinigtem Leuchtgas.

## Beiträge zur Physiologie überlebender Säugetierherzen.

VII. Mitteilung:

Über den Verbrauch der Katzenherzen an verschiedenen Zuckerarten.

Von

Rudolf von Pomóthy.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der kgl. ung. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 18. Februar 1933.)

Das überlebende, von einer zuckerhaltigen Lösung durchströmte Herz ist besonders geeignet zum Studium solcher Probleme, die den Verbrauch von Zucker durch kontraktile Elemente zum Gegenstand haben; allerdings mit der Einschränkung, daß die Abnahme der Zuckerkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit als Zuckerverbrauch aufgefaßt wird, obzwar ohne hierauf gerichtete Untersuchungen nicht gesagt werden kann, welcher Anteil des verschwundenen Zuckers von den Herzmuskelfasern wirklich verbraucht und welcher als Glykogen eingelagert wurde. Besonderes Interesse kommt dieser Frage zu, wenn die Versuche nicht mit Glucose — der adäquaten Nahrung der Muskelzellen —, sondern mit anderen Zuckerarten ausgeführt werden. Wenn man von Angaben über die Beeinflussung der mechanischen Tätigkeit des überlebenden Herzens durch verschiedene Zuckerarten absieht, so kommt für die obschwebende Frage nur eine recht geringe Anzahl von Mitteilungen in Betracht; ihre Ergebnisse sollen im Anschluß an die Besprechung der meinigen gewürdigt werden.

### A. Methodik der Versuche.

Meine Versuche wurden an Katzenherzen und, abgesehen von geringen Abweichungen, so ausgeführt, wie dies bei *Ambrus* und *Aszódi*<sup>1</sup> beschrieben ist, daher hier nur die wichtigsten Momente in aller Kürze angeführt seien.

Die mit Äther narkotisierte Katze wurde durch die Carotis entblutet und durch Einlaufenlassen einer Tyrodelösung bei der Jugularis blutfrei gewaschen (in späteren Versuchen wurde hierzu eine zuckerhaltige Tyrode-

---

<sup>1</sup> Diese Zeitschr. 183, 408, 1927.

lösung verwendet; hierüber siehe weiter unten). Nun wurde das frei präparierte und aus dem Brustkorb entfernte Herz mit dem Kreislaufapparat verbunden, der bis zum oberen Rande der Glocke, die das Herz enthält, in ein Wasserbad von 40° C taucht. Der Apparat wurde schon vorher mit 150 ccm der 0,2 % des Zuckers enthaltenden Tyrodelösung beschickt, die nun durch ein Pumpwerk unter einem 90 mm Hg betragenden Drucke (aus einer Sauerstoffdruckflasche) durch das Herz getrieben wurde. Die Durchströmung erfolgte stets in drei je 1 Stunde lang währenden Perioden. Zwischen der ersten und zweiten, sowie zwischen dieser und der dritten Periode wurde das Herz, wie zu aller Anfang, ausgewaschen und wieder in den Apparat eingesetzt, in dem die Durchströmungsflüssigkeit inzwischen durch frische 150 ccm ersetzt ward. Am Ende der dritten Periode wurde das Herz aus den Apparat genommen, von der Aortenkanüle abgeschnitten, nach der Vorschrift von *Aszódi*<sup>1</sup> das feuchte Herzgewicht und die Trockensubstanz des Herzens bestimmt, und der in den drei Perioden bestimmte Zuckerverbrauch auf 1 g des feuchten und 1 g des trockenen Herzgewichtes bezogen. Zur Ermittlung des Zuckerverbrauches wurde in der jeweils am Ende einer Periode dem Apparat entnommenen Lösung (nach Entweißung durch Zusatz von gleichen Teilen der *Bang*schen Flüssigkeit, Stehenlassen durch 1/2 Stunde und Filtrieren) der Zuckergehalt nach *Bertrand* bestimmt und mit dem vorangehend ebenfalls nach *Bertrand* bestimmten, ursprünglichen Zuckergehalt der Lösung verglichen.

Einige Schwierigkeiten ergaben sich bei den Versuchen mit Lactose, noch mehr mit Maltose, daraus, daß die Zuckerkonzentration der verwendeten Tyrodelösung, einerseits aus der genau abgewogenen Zuckermenge berechnet, andererseits nach *Bertrand* bestimmt, nicht gut übereinstimmte. Ich glaube die Folgen dieser Unstimmigkeit dadurch zum größten Teile ausgemerzt zu haben, daß ich die Zuckerkonzentration am Ende der Periode wohl aus der Menge des Reduktionsproduktes berechnet habe, jedoch dieser Berechnung nicht die *Bertrand*schen Tabellen, sondern das Verhältnis zugrunde legte, das an der frischen, unbenutzten Lösung zwischen Menge des Reduktionsproduktes und der durch Abwägen ermittelten Zuckerkonzentration zu berechnen war.

Die Berechnung des Zuckerverbrauches, so wie dies von den genannten Autoren beschrieben wurde, ist an sich recht einfach; doch muß ich auf eine Fehlerquelle dieser Berechnung hinweisen, die in einer ersten Reihe von Versuchen auch von mir dadurch begangen wurde, daß beim Auswaschen des Herzens, um es blutfrei zu bekommen, zuckerfreie Tyrodelösung zur Verwendung kam. Dabei wurde aber übersehen, daß das Volumen der zuckerhaltigen Durchspülungsflüssigkeit durch ein nicht bestimmbares Volumen der zuckerfreien Lösung vergrößert ward, das eben im Herzen zurückgeblieben war, namentlich aber in der Aortenkanüle eingefüllt werden mußte, um diese luftblasenfrei in den Kreislaufapparat einfügen zu können. Hierdurch wurde aber eine entsprechende Verringerung der Zuckerkonzentration bewirkt, die den Zuckerverbrauch am Ende der Periode *größer* erscheinen ließ als er es in Wirklichkeit gewesen ist. Der Fehler ließ sich in späteren Versuchen dadurch verringern, daß ich das Herz mit derselben zuckerhaltigen Tyrodelösung auswusch, und dieselbe Lösung auch in die Aortenkanüle einfüllte, die im eigentlichen Versuch verwendet wurde. Auf diese Weise erscheint zwar der Zuckerverbrauch *kleiner*, als er es in Wirklichkeit war, doch ist der Fehler geringer, weil ja hier nur das Volumen

<sup>1</sup> Diese Zeitschr. 185, 450, 1927.

der Durchströmungsflüssigkeit nicht ganz genau bekannt ist, während beim Durchwaschen mit der *zuckerfreien* Lösung dies auch betreffs der anfänglichen Zuckerkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit der Fall ist. Dies läßt sich an der Hand des nachfolgenden Beispielles leicht zeigen. Es sollen, wie in allen Versuchen, 150 ccm der 0,2 %igen Zuckerlösung in den Apparat eingefüllt worden sein, und es soll angenommen werden, daß die Zuckerkonzentration am Ende der Periode 0,15 % betragen hat.

a) Ist die Waschflüssigkeit zuckerfrei, so ergibt sich bei unserer Berechnungsart, da der Volumenzuwachs nicht bekannt ist, ein Zuckerverbrauch von 0,075 g, da anfangs enthalten waren in 150 ccm 0,2 %iger Lösung 0,300 g, am Ende enthalten waren in 150 ccm 0,15 %iger Lösung 0,225 g; Unterschied 0,075 g; während in Wirklichkeit, wenn man beispielsweise annimmt, daß 10 ccm zuckerfreie Lösung hinzugekommen sind, der Zuckerverbrauch nur 0,060 g betragen hat, da anfangs vorhanden waren in 150 ccm 0,2 %iger Zuckerlösung plus 10 ccm zuckerfreier Lösung, 0,300 g, am Ende der Periode in 160 ccm 0,15 %iger Lösung 0,240 g; Unterschied 0,060 g.

b) Enthält hingegen die zum Auswaschen usw. verwendete Flüssigkeit genau so wie die Durchströmungsflüssigkeit 0,2 % Zucker, so ergibt sich bei unserer Berechnungsart, da der Volumenzuwachs nicht bekannt ist, wie oben ein Zuckerverbrauch von 0,075 g, während in Wirklichkeit, wenn man wieder einen Volumenzuwachs von 10 ccm annimmt, der Zuckerverbrauch 0,080 g beträgt, da anfangs vorhanden waren in 160 ccm 0,2 %iger Zuckerlösung 0,320 g, am Ende vorhanden waren in 160 ccm 0,15 %iger Zuckerlösung 0,240 g; Unterschied 0,080 g.

Man sieht, daß der Fehler bei Verwendung der *zuckerfreien* Waschflüssigkeit weit größer ist; doch läßt er sich in Versuchen mit einem einigermaßen größeren Zuckerverbrauch (z. B. Glucose), weit besser ertragen, als wenn es sich um eine Zuckerart handelt, die vom Herzen kaum oder gar nicht verbraucht wird (z. B. Maltose).

Wie bei allen ähnlichen bei Körpertemperatur ausgeführten und stundenlang währenden Versuchen an überlebenden Organen, mußte auch hier daran gedacht werden, ob nicht etwa Bakterien am Verschwinden des Zuckers beteiligt sind. Um diesem etwaigen Einwand zu begegnen, habe ich die Versuche 155, 156 und 157 unter möglichst sterilen Bedingungen ausgeführt, namentlich die Glasteile des Apparates längere Zeit im Thermostaten bei 140° C belassen; der Zuckerverbrauch gestaltete sich im großen und ganzen nicht anders als in den übrigen Versuchen.

## B. Ergebnisse meiner Versuche.

### 1. Versuche mit Glucose.

Bei dem Umstande, daß sich im Durchströmungsapparat die überlebenden Herzen weit entfernt von ideal physiologischen Verhältnissen befinden, ferner bei den prekären Einzelheiten in der Handhabung der Apparatur, endlich infolge des individuellen Unterschiedes der Herzen, war ich mir dessen wohl bewußt, daß aus den erhaltenen Werten die Ergebnisse nicht so ohne weiteres abzulesen sein werden. Namentlich konnten die an anderen Zuckerarten erhaltenen Werte nur in dem Falle der Kritik standhalten, wenn ich in dem auch von



Tabelle I.  
Versuche mit Glucose.

Versuch	Geschlecht	Körpergewicht	Herzgewicht	Zuckerverbrauch pro Std. und pro g feuchtes Herzgewicht				Herz-trockengewicht	Zuckerverbrauch pro Std. und pro g Trockengewicht				Bemerkungen	
				Periode I	Periode II	Periode III	Periode I—II—III		Periode I	Periode II	Periode III	Periode I—II—III		
Nr.		g	g	mg	mg	mg	mg	g	mg	mg	mg	mg		
154	♂	2800	14,1	7,9	9,9	8,3	8,7	1,72	64,6	82,1	68,0	71,6	Mit zuckerfreier Tyrodelösung gewaschen.	
155	♂	2700	14,4	6,1	7,3	6,9	6,8	2,02	43,8	52,3	49,5	48,5		
156	♀	2600	14,2	9,9	9,9	9,1	9,6	1,53	91,9	91,9	83,8	89,2		
157	♂	3100	17,0	5,2	9,5	12,1	8,9	2,37	37,1	67,9	86,9	64,0		
158	♀	2800	15,1	6,4	6,4	5,4	6,1	1,64	58,7	58,7	49,5	55,6		
159	♀	3600	17,0	5,3	5,7	5,3	5,4	1,76	51,6	54,7	50,7	52,3		
		Mittelwerte:												
160	♀	3000	12,3	6,6	10,4	8,7	8,6	1,57	52,1	81,6	68,5	67,4	Mit zuckerfreier Tyrodelösung gewaschen.	
161	♂	3720	21,0	5,2	6,6	6,6	6,1	2,52	43,5	54,9	55,1	51,2		
162	♀	3250	15,0	9,5	8,5	5,8	7,9	1,67	85,2	76,0	52,1	71,1		
163	♂	3850	18,9	7,1	7,6	7,3	7,3	2,24	60,3	64,4	61,9	62,2		
164	♀	3460	16,0	7,1	8,8	6,4	7,4	1,86	61,3	75,8	54,7	63,9		
		Mittelwerte:												
165	♂	3070	17,0	6,1	5,8	6,8	6,2	1,79	57,8	54,8	65,1	59,2	Mit zuckerhaltiger Tyrodelösung gewaschen.	
166	♂	4220	17,8	3,7	5,2	5,9	4,9	2,03	32,6	45,8	52,1	43,5		
167	♂	3120	12,6	7,3	9,2	7,5	8,0	1,52	60,3	76,1	62,0	66,1		
		Mittelwerte:												

13\*

*Ambrus* und *Aszódi* benutzten Apparat für Glucose annähernd dieselben Werte erhielt, wie diese beiden Autoren. Aus diesem Grunde habe ich zuerst Versuche mit Glucose ausgeführt, und es seien zunächst diese, in Tabelle I zusammengestellten Ergebnisse besprochen. Wie zu ersehen, war der Zuckerverbrauch in den einander folgenden drei Perioden meistens kein gleicher, und zwar in der zweiten in der Regel größer als in der ersten, wie sehr oft auch in den späteren Versuchen von *Ambrus*<sup>1</sup>; während in seinen früheren Versuchen umgekehrt die erste Periode die größeren Werte aufwies. Um ihre teilweise recht divergierenden Daten bewerten zu können, haben die genannten Autoren einen Mittelwert aus den drei Perioden berechnet, und wohl oder übel mußte ich dasselbe tun.

Da ferner im Laufe der Durchströmung eine sehr beträchtliche ödematöse Schwellung, daher auch Gewichtszunahme des Herzens stattfindet, entsprechen, wie bei *Aszódi* ausgeführt, die auf 1 g Herztrockensubstanz bezogenen Werte der Wirklichkeit besser als diejenigen, die auf 1 g des feucht gewogenen Herzens bezogen sind. Zu bemerken ist auch, daß die Trockensubstanz nicht in allen 14 Glucoseversuchen auf dieselbe Weise bestimmt wurde. So wurde in Versuchen 154 bis 159 das Herz zwar klein geschnitten, doch diese Masse in *einem* bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, während in allen nachfolgenden Versuchen dem lufttrocken gewogenen Pulver zwei Proben entnommen und diese bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden. Auch unterschieden sich Versuch 165 bis 167 von den vorangehenden dadurch, daß das Herz mit zuckerhaltiger Tyrodelösung gewaschen wurde, während in den vorangehenden zuckerfreie Lösung zur Verwendung kam.

Auf diese Weise mußten die Ergebnisse der Versuche auf drei Gruppen verteilt berechnet werden, und es geht aus ihnen hervor, daß der Zuckerverbrauch ganz ähnlich war, wie bei *Ambrus*, bei *Aszódi* und bei *Ambrus*:

	Zuckerverbrauch pro Std. und pro g	
	feuchtes Herzgewicht mg	Trockensubstanz mg
In meinen Versuchen 154 bis 159 . . . . .	7,6	63,5
„ „ „ 160 „ 164 . . . . .	7,6	63,3
„ „ „ 165 „ 167 . . . . .	6,4	56,3
„ <i>Ambrus'</i> früheren Versuchen . . . . .	6,6	56,5
„ <i>Aszódi's</i> Versuchen . . . . .	6,3	58,6
„ <i>Ambrus'</i> späteren Versuchen . . . . .	7,5	62,8

Aus den weiter oben dargetanen Gründen können wir die auf die Herztrockensubstanz bezogenen Werte als die richtigeren ansehen. Die von mir errechnete Trockensubstanz betrug wie bei *Ambrus* und bei *Aszódi* nicht mehr als etwa 10 bis 14% des feuchten

<sup>1</sup> Diese Zeitschr. 204, 467, 1929.

Herzgewichtes, und zwar größtenteils infolge der ödematösen Anschwellung, teils aber, weil das Fett durch Auskochen, die letzten Reste der großen Gefäße aber mit der Pinzette entfernt wurden. Auch darin stimmen meine Versuche mit denen von *Ambrus* und *Aszódi* überein, daß die Herzen im großen und ganzen verhältnismäßig um so weniger Zucker verbrauchten, je größer sie waren, und umgekehrt, wie dies aus Tabelle II hervorgeht. In der Tabelle II habe ich die Versuche 154 bis 159 und 160 bis 164 in eine Gruppe eingeteilt, da, wie aus Tabelle I ersichtlich, die beiden Gruppen gleich große Mittelwerte lieferten. Eine fehlerfreie Reihenfolge der Zahlenwerte konnte natürlich nicht erwartet werden, doch ist klar zu ersehen, daß Zahlen wie 71, 72 und 89 nur in den Versuchen mit den kleinen Herztrockengewichten von 1,53 bis 1,72 g vorkommen, und umgekehrt Zahlen wie 48, 51, 52 nur in den Versuchen mit den größeren Herztrockengewichten von 1,76 bis 2,52 g.

Tabelle II.

Versuch Nr.	Herztrocken- gewicht g	Zuckerverbrauch pro Std. und pro g Herz- trockengewicht mg	Versuch Nr.	Herztrocken- gewicht g	Zuckerverbrauch pro Std. und pro g Herz- trockengewicht mg
156	1,53	89	167	1,52	66
160	1,57	71	165	1,79	59
158	1,65	56	166	2,03	44
162	1,67	71			
154	1,72	72			
159	1,76	52			
164	1,86	64			
155	2,02	48			
163	2,24	62			
157	2,37	64			
161	2,52	51			

## 2. Versuche mit anderen Zuckerarten.

Als es sich bereits in den ersten mit Fructose ausgeführten Versuchen herausstellte, daß hier wesentlich weniger verbraucht wird, mußte der Verdacht aufkommen, daß dieser Unterschied durch irgendeine nicht beachtete Änderung im Zustande oder in der Handhabung der Apparatur verursacht wird. Um diesen Einwand zu entkräften, habe ich weiterhin, wie aus Tabelle III ersichtlich, mehrmals zwischen die Versuche mit anderen Zuckerarten je einen Versuch mit Glucose eingeschaltet. Da ich hierbei mit Glucose stets die größeren, auch früher konstatierten Werte erhielt, konnte kein Zweifel darüber bestehen, daß auch die Versuche mit anderen Zuckern richtig ausgeführt wurden. Ihre Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengestellt, doch nur so weit, als zum Auswaschen des Herzens usw. eine zuckerhaltige Lösung verwendet wurde. Denn, wie schon erwähnt, kommt der durch die Ver-

Tabelle III.

Datum des Versuchs	Versuch Nr.	Zuckerart	Datum des Versuchs	Versuch Nr.	Zuckerart
7. IX.	177	Maltose	29. X.	165	Glucose
10. IX.	178	Maltose	31. X.	170	Mannose
19. IX.	180	Lactose	2. XI.	175	Galaktose
29. IX.	165	Glucose	3. XI.	172	Fructose
1. X.	171	Fructose	5. XI.	166	Glucose
6. X.	181	Lactose	12. XI.	176	Galaktose
15. X.	174	Galaktose	19. XI.	173	Fructose
19. X.	168	Mannose	24. XI.	182	Lactose
22. X.	169	Mannose			

wendung zuckerfreier Waschflüssigkeit begangene Fehler nicht allzusehr in Betracht, wenn es sich um Versuche mit einem einigermaßen erheblichen Zuckerverbrauch handelt; wohl aber kann dieser Fehler einen geringen Verbrauch stark vergrößert erscheinen lassen, ja sogar einen Verbrauch in Versuchen vortäuschen, in denen überhaupt keiner stattgefunden hat.

*Versuche mit Mannose.* Es kam Mannose „Kahlbaum“ zur Verwendung. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, betrug der Zuckerverbrauch nur etwa zwei Drittel des Glucoseverbrauches; in allen drei Versuchen wurde, wie bei der Glucose, in der zweiten Periode mehr verbraucht als in der ersten Periode.

*Versuche mit Fructose.* Das Präparat hatte die Bezeichnung Lävulose reinst, kristallin. pulver. Kahlbaum. Der Zuckerverbrauch betrug im Mittelwert der drei Versuche bloß ein Fünftel des Glucoseverbrauches, und zwar nahm er im Gegensatz zu den Glucose- und Mannoseversuchen bis zum Ende des Versuchs mehr oder minder stark ab.

*Versuche mit Galaktose.* Das Präparat war Galaktose „Kahlbaum“. Der Verbrauch war noch geringer als bei der Fructose: er betrug nur mehr etwa den sechsten Teil des bei Glucose erhaltenen Wertes, und die Abnahme des Verbrauches war bis an das Ende des jeweiligen Versuchs noch stärker als bei der Fructose.

*Versuche mit Maltose und Lactose.* Zur Verwendung kamen Maltose „Kahlbaum“ und Lactose (ohne andere Bezeichnung). Die Ausschläge, die ich erhielt, waren so minimal, daß sie die unvermeidlichen Fehler, begangen beim Abmessen des Volumens der Durchströmungsflüssigkeit, sowie bei der Zuckerbestimmung, nicht überschritten, daher läßt sich sagen, daß die Herzen weder Maltose, noch aber Lactose verbrauchen.

Will man die von früheren Autoren erhaltenen Werte mit den von mir (bzw. auch von *Ambrus* und *Aszódi*) gefundenen vergleichen, so können, da jene sich stets auf das feucht gewogene Herz beziehen, zu diesem Vergleich meine richtigeren auf die Herztrockensubstanz

Tabelle IV.

Versuch Nr.	Geschlecht	Körpergewicht g	Fenches Herzgewicht g	Zuckerverbrauch pro Sld. und pro g feuchtes Herzgewicht			Herz- trocken- gewicht g	Zuckerverbrauch pro Sld. und pro g Herztrockengewicht				
				Periode I mg	Periode II mg	Periode III mg		Periode I mg	Periode II mg	Periode III mg		
Versuche mit Mannose.												
168	♀	2850	14,8	4,4	4,6	3,5	4,2	1,57	41,1	43,7	32,8	39,2
169	♂	3200	14,7	3,4	4,8	4,0	4,1	1,67	29,6	42,5	35,6	35,9
170	♀	3500	17,5	3,6	4,7	3,7	4,0	1,95	32,2	42,1	32,8	35,7
		Mittelwerte:					<b>4,1</b>					<b>36,9</b>
Versuche mit Fructose.												
171	♂	3820	18,6	1,5	1,3	1,2	1,3	1,92	14,1	13,0	11,1	12,7
172	♂	2700	13,8	1,8	1,7	0,9	1,5	1,45	17,6	16,2	8,7	14,2
173	♀	2450	14,7	1,6	1,1	0,8	1,2	1,65	14,5	9,4	7,2	10,4
		Mittelwerte:					<b>1,3</b>					<b>12,4</b>
Versuche mit Galaktose.												
174	♀	3310	16,6	1,0	0,8	0,2	0,7	1,83	9,0	6,8	2,0	5,9
175	♀	2650	15,5	1,5	1,1	1,2	1,3	1,81	12,4	9,3	9,9	10,5
176	♀	2850	13,8	1,4	1,0	0,5	1,0	1,25	15,7	10,8	5,0	10,5
		Mittelwerte:					<b>1,0</b>					<b>9,0</b>

bezogenen Werte nicht herangezogen werden. Aus der Tabelle V ist ersichtlich, daß ich stets weit größere Werte erhielt als die früheren Autoren. In den von *Camis* an Katzen- und Kaninchenherzen, sowie von *Maclean* und *Smidley* an Kaninchenherzen ausgeführten Versuchen fehlen die Angaben über das Herzgewicht, weshalb in der Tabelle V diese Befunde nur als positiv oder negativ eingetragen werden konnten. In einem mit Lactose ausgeführten Kaninchenversuch wird zwar von *Camis* das Herzgewicht mitgeteilt, doch auch angegeben, daß die Lactose teilweise verbraucht, teilweise aber nur gespalten wurde.

Tabelle V.

Zuckerverbrauch pro 1 Stunde und 1g feuchtes Herzgewicht;  
in Milligramm.

Autor	Tierart	Mannose	Fructose	Galaktose	Lactose	Maltose
<i>Camis</i> *	Katze		—	—	—	—
	Kaninchen		+	—	+	±
<i>Rona u. Neukirch</i> **	Kaninchen	0,8	—	0,6	—	—
<i>Maclean-Smidley</i> ***	Kaninchen	+	—	+		—
	Hund	0,7	0,3	0,3—0,4		
Eigene Versuche	Katze	4,1	1,3	1,0	0	0

\* Archiv di Farmacol. 15, 481, 1913.

\*\* Pfügers Arch. f. d. ges. Physiol. 148, 285, 1912.

\*\*\* J. of Physiol. 45, 462, 1912.

Was endlich die Größe des Zuckerverbrauches im Verhältnis zur sichtbaren Stärke der Herzaktion (Frequenz, Art der Kontraktion) anbelangt, fand ich in Übereinstimmung mit *Aszódi*, daß ein solches Verhältnis innerhalb der mit *einer* Zuckerart ausgeführten Versuche nicht nachzuweisen ist. Wohl unterschieden sich aber die mit *verschiedenen* Zuckerarten ausgeführten Versuchsgruppen darin, daß in Glucoseversuchen eine grob sichtbare Schwächung der Herzaktion bloß in der dritten, bei der Mannose bereits in der zweiten, Periode, bei den anderen Zuckerarten oft schon gegen Ende der ersten Periode zu beobachten war.

Durch obige auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. *Hári* ausgeführten Versuche werden die früheren auf den Glucoseverbrauch überlebender Herzen bezüglichen Befunde von *Ambrus* und von *Aszódi* bestätigt. Weiterhin wird gezeigt, daß von den anderen Zuckerarten weniger verbraucht wird; dem Verbrauch an Glucose kommt noch am nächsten der Verbrauch an Mannose, der der Glucose stereochemisch am nächsten stehenden Aldoheose. Von der der Glucose ebenfalls nahestehenden Ketoheose, der Fructose, wird weit weniger verbraucht.

## Über die eisenhaltige Komponente des Blutfarbstoffes und ihre Synthese mit Globin zu Hämoglobin.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von  
Alfred Herzog.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der kgl. ung. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 20. Februar 1933.)

Im Laufe von Untersuchungen, die die prosthetische Gruppe des Blutfarbstoffes zum Gegenstande hatten, gelang es mir, aus in der Hitze koaguliertem Blute durch Extrahieren mit essigsaurem Methylalkohol und Siedenlassen dieses Extraktes im Wasserbad eine Verbindung darzustellen, die auf Grund ihrer prozentualen Zusammensetzung der Formel  $C_{34}H_{33}N_4O_5Fe$ , also einem kristallisierten Hämatin entspricht. Indem ich die wässrig-ammoniakalisch-methylalkoholische Lösung dieser Substanz in ein im Wasserbad siedendes Gemisch von Eisessig und Methylalkohol eintrug und sieden ließ, oder aber auch durch Extrahieren kristallisierten Oxyhämoglobins mit wässrig-ammoniakalischem Methylalkohol, Zufügen von Eisessig bis zu 15 % und Stehenlassen erhielt ich ferner eine kristallisierte Verbindung von der Formel  $C_{34}H_{33}N_4O_4Fe$ , die also, da sie nur vier Sauerstoffatome enthält, auf Grund der bisherigen Vorstellungen dem „reduzierten Hämatin“ entsprechen müßte. Beide Substanzen waren durch Erhitzen mit NaCl und Eisessig in *Teichmannsche* Kristalle überföhrbar.

Aus den beiden genannten Substanzen einerseits und aus Chlorhämין andererseits konnte ich durch Lösen dieser Substanzen in wässrig-ammoniakalischem Methylalkohol und vorsichtigen Zusatz von Eisessig zu einer dritten kristallisierten, eisenhaltigen Substanz gelangen, der auf Grund der Analysenergebnisse die Formel  $C_{33}H_{30}N_4O_4Fe$  oder  $C_{33}H_{31}N_4O_4Fe$  am besten entspricht. *Diese Substanz konnte in die Ausgangssubstanzen wieder überföhrt werden.* Schließlich konnte ich die Substanz mit 33 Kohlenstoffatomen aus Oxyhämoglobin und Kohlenoxydhämoglobin mit der gleichen Methode direkt auskristallisieren.

Verschiedene Beobachtungen bei meinen Experimenten und verschiedene Unstimmigkeiten der Literatur führten mich zu der Annahme, daß die prosthetische Gruppe des Blutfarbstoffes nicht, wie bisher angenommen wird, das Hämatin sein könne, sondern daß die von mir dargestellte Substanz mit 33 Kohlenstoffatomen es sein muß. Zum

Beweise dieser Anschauung ging ich daran, die Substanz mit nativem Globin zu Hämoglobin zu koppeln, und es gelang mir schließlich nach mühevollen Vorversuchen zu reinen Lösungen von Kohlenoxydhämoglobin und Methämoglobin zu gelangen, während die des Oxyhämoglobins bisher immer mehr oder weniger mit Methämoglobin verunreinigt waren. Die spektrophotometrisch ermittelte Lichtabsorptionskurve der reinen Lösungen von Kohlenoxydhämoglobin und Methämoglobin stimmt mit der verlangten überein. Weiterhin wurden von mir aus einer Lösung von synthetisiertem Kohlenoxydhämoglobin, das aus analysierten Präparaten der Substanz mit 33 Kohlenstoffatomen dargestellt worden war, *durch Erhitzen mit NaCl und Eisessig typische Teichmannsche Kristalle erhalten.*

Auf Grund dieser meiner Untersuchungen, von denen ich hier nur die wichtigsten Ergebnisse kurz beschrieben habe, fühle ich mich zu der Feststellung berechtigt, daß a) das 34. Kohlenstoffatom des Chlorhämins bei dessen Darstellung in die kohlenstoffärmere, eisenhaltige Komponente eindringt; daß b) die prosthetische Gruppe aber nur 33 Kohlenstoffatome besitzt, demnach eine unsymmetrische Konstitution aufweisen muß. Aus diesem Ergebnis ergibt sich aber auch eindeutig, daß das Ätioporphyrin, als die gemeinsame Stammsubstanz der prosthetischen Gruppe des Blutfarbstoffes und des Chlorophylls, in Übereinstimmung mit *R. Willstätter* 31 Kohlenstoffatome enthalten muß.

Bezüglich der genaueren Wiedergaben der Methoden und der Zusammenhänge der Substanz mit 33 Kohlenstoffatomen mit der bisherigen Lehre über die Hämine sei auf die in nächster Zeit erscheinenden Mitteilungen verwiesen.



*Sonderabdruck*  
*aus „Biochemische Zeitschrift“ 264, 412, 1933.*  
*Verlag von Julius Springer, Berlin W 9.*

# Über die prothetische Gruppe des Blutfarbstoffes, deren kristallinische Isolierung und deren Synthese mit nativem Globin zu Hämoglobin.

Von  
Alfred Herzog.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 7. Juli 1933.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

In einer vorläufigen Mitteilung<sup>1</sup> habe ich kurz über die Ergebnisse von Untersuchungen über die eisenhaltige Komponente des Blutfarbstoffes berichtet, die mich seit längerer Zeit beschäftigt hatten. Diese Untersuchungen führten zu verschiedenen Ergebnissen, darunter auch zur *Reindarstellung einer kristallisierten, eisenhaltigen Substanz, die jedoch abweichend von den herkömmlichen Häminderivaten mit 34 C-Atomen deren nur 33 im Molekül enthält und die mit nativem Globin beliebig zu Oxy-, CO-, reduziertem und Methämoglobin gekoppelt werden kann.* Diese grundlegenden Ergebnisse will ich aus meinem bisher fertiggestellten Material herausgreifen und als erste Mitteilung veröffentlichen.

## A. Darstellung und Eigenschaften der neuen Verbindung.

Es gelang mir, die Substanz darzustellen aus:

1. *Schalfejewischem Häm*. Ich bereitete mittels wässerigen ammoniakalischen Methylalkohols (2 Teile konz. wässriges Ammoniak, 3 Teile destilliertes Wasser zu 20 Teilen Methylalkohol) eine möglichst konzentrierte Lösung, und gab zur filtrierten Lösung, die ich in einer mit einem Glasstöpsel verschließbaren Mensur aufbewahrte, *vorsichtig* mehrmals am Tage einige Tropfen Eisessig unter sofortigem Durchmischen zu (pro 100 ccm Lösung etwa dreimal am Tage 6 bis 8 Tropfen). Im Laufe mehrerer Tage, oft schon nach einigen Stunden, bilden sich blauschwarze, meist schon makroskopisch erkennbare Kristalle, die sich in charakteristischer Weise an den Gefäßwänden absetzen. Bei der Zugabe von Eisessig ist darauf

---

<sup>1</sup> A. Herzog, diese Zeitschr. 260, 213, 1933.

Bedacht zu nehmen, daß die *ammoniakalische Reaktion erhalten bleibt*, denn im Falle saurer Reaktion fallen Derivate der Substanz aus. Man unterbricht die Zugabe von Eisessig, wenn sich die vorher undurchsichtige Lösung aufgehellt hat und man merkt, daß bei weiterer Zugabe von Eisessig kaum mehr Substanz auskristallisiert. Zu dieser Zeit enthält der Methylalkohol noch gewisse Mengen der Substanz gelöst, da diese in reinem Methylalkohol etwas löslich ist. Die Kristalle werden von den Gefäßwänden mit Hilfe eines Glasstabes abgekratzt, auf einem Filter gesammelt und zuerst mit einem Gemisch Methylalkohol-Äther 1 : 3, später mit reinem Äther gewaschen und schließlich bei etwa 38 und 90° C getrocknet. Die *Umkristallisation* erfolgte in Anlehnung an die Methode der Darstellung durch Lösen in wässrigem, ammoniakalischem Methylalkohol in dem angegebenen Verhältnis und vorsichtiger Zugabe von Eisessig. Um eine möglichst konzentrierte Lösung zu erhalten, empfiehlt es sich, die Substanz, die oft in sehr großen Kristallen ausgefallen ist, zu pulverisieren, das Pulver zuerst in dem äquivalenten Teile destillierten Wassers aufzuschwemmen, zu schütteln und nachher erst die entsprechenden Mengen wässrigen konz. Ammoniak und Methylalkohols zuzugeben.

Die Substanz kristallisiert in Rhomben und rhomboiden Nadeln (Abb. 1 und 2), wobei erstere oft zu größeren Drusen, letztere zu Sphäro-

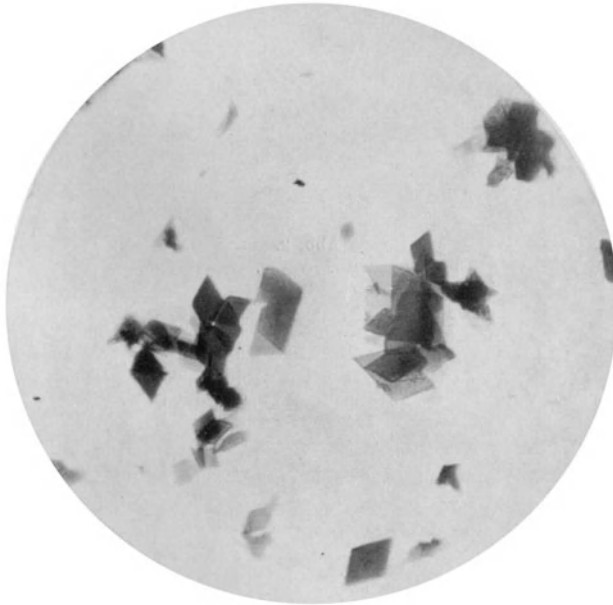


Abb. 1.  
Hämatoprothetin. Vergr. etwa 400fach.

kristallen zusammengelagert sind. Zwischen den beiden Varianten finden sich oft alle möglichen Übergänge. Getrocknet zeigt die Substanz einen blauschwarzen Farbenton und je nach Auskristallisation ver-

schieden stark ausgeprägten Metallglanz. Dieser war bei Kristallisation in Rhomben stärker, bei Kristallisation in rhomboiden Nadeln schwächer. Die Verbindung ist gut löslich in konzentriertem Ammoniak, 1%iger NaOH, 5%iger Sodalösung, Eisessig, Pyridin, schwächer löslich in

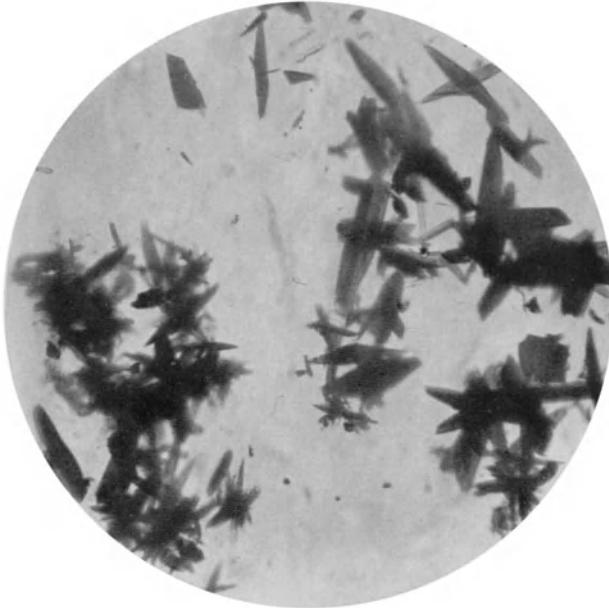


Abb. 2.  
Hämatoprosthetin. Vergr. etwa 400fach.

Chloroform und Methylalkohol, in Spuren löslich in Äthylalkohol und unlöslich in Aceton, Äther, verdünnten Mineralsäuren und destilliertem Wasser. Die Lösung in Pyridin zeigt nach Reduktion ein Hämochromogenspektrum, und in diesem Zustande bindet die Verbindung Kohlenoxyd reversibel. Ein Schmelzpunkt konnte nicht ermittelt werden; die Substanz blieb bis 250° C unverändert. *Mit Kochsalz und Eisessig unter dem Deckglase erhitzt, konnte die Substanz nicht in Teichmannsche Kristalle überführt werden.* (Aus Schalfefewschem Hämin wurden die Präparate 16, 18 und 22 dargestellt.)

2. *Aus OHb und COHb.* Kristallkuchen von OHb und COHb wird in wenig destilliertem Wasser zerteilt, aufgeschwemmt und wässriger, ammoniakalischer Methylalkohol zugegeben, wobei der Kuchen zu einer dichten Gallerte aufquillt. Man gibt so viel wässrigen ammoniakalischen Methylalkohol zu, bis keine Gallerte mehr entsteht, läßt sodann unter öfterem Umrühren einige Stunden extrahieren, dekantiert von der Gallerte ab, versetzt das Extrakt, das neben Farbstoff auch ziemlich viel Globin gelöst enthält, unter dauerndem Umrühren pro 200 ccm mit 10 bis

12 Tropfen Eisessig und zentrifugiert etwa 10 Minuten scharf ab. Unterdessen fällt das bis dahin gelöste Globin aus und sammelt sich am Boden des Zentrifugenglases an. Die Farbstofflösung wird dekantiert und es wird durch nochmaliges Ansäuern mit Eisessig und Zentrifugieren versucht, die Farbstofflösung von noch in Lösung vorhandenen Globinresten weiter zu befreien. Die Farbstofflösung wird filtriert und der Farbstoff durch vorsichtige Zugabe von Eisessig in der unter 1. beschriebenen Weise zur Kristallisation gebracht. (Aus OHb wurde Präparat 48 und aus COHb Präparat 65 dargestellt.)

3. Aus einer kristallisierten Substanz von der Zusammensetzung  $C_{34}H_{33}N_4O_4Fe$ ; über diese Substanz soll an einer anderen Stelle berichtet werden. Die Darstellung der in Frage stehenden Verbindung erfolgte, wie unter 1. beschrieben wurde (Präparate 14, 15, 21 und 35).

4. Aus einer hämatinartigen kristallisierten Substanz von bisher nicht genau festgelegter Zusammensetzung, über die ebenfalls später berichtet werden soll. Darstellung der in Frage stehenden Substanz wie unter 1. (Präparate 32, 42 und 43).

Die nach 2. bis 4. dargestellten Präparate erwiesen sich mit dem aus Schälfejew'schem Hämin gewonnenen identisch.

### B. Feststellung der empirischen Formel.

Die Analysen wurden von Herrn Dr. M. K. Zacherl im medizinisch-chemischen Institut der Universität Graz ausgeführt, wobei ihm an dieser Stelle bestens gedankt sei. Alle Präparate wurden vor der Analyse bei  $100^{\circ}C$  im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Bei den in der Tabelle I angegebenen Analysenergebnissen ist neben der Nummer der Präparate in der Klammer das Ausgangsmaterial, aus welchem die Substanz gewonnen worden war, und die Tierart angeführt. Die Bestimmung des Stickstoffs erfolgte nach *Dumas-Pregl* (Tabelle I).

Bei den Präparaten 16, 18 und 22 ausgeführte Chlorbestimmungen, desgleichen vorsichtshalber bei den Präparaten 15, 22, 32 und 42 ausgeführte Acetylbestimmungen verliefen negativ.

In der Tabelle II sind die prozentualen Mittelwerte der Parallelanalysen und die sämtlicher Präparate angegeben. Für die berechnete Formel habe ich  $Fe'''$  angenommen.

Aus Gründen, die sich aus der Arbeit ergeben, will ich diese neue Verbindung von der Formel  $C_{33}H_{31}N_4O_4Fe$  als „Hämatoprosthetin“ bezeichnen.

Die Tatsache, daß ich aus verschiedenen Ausgangsprodukten, darunter auch aus OHb und COHb, zu ein und derselben Kernsubstanz, dem Hämatoprosthetin, gelangt bin, weiterhin aber auch verschiedene Unstimmigkeiten der Literatur führten mich zu der Auffassung, daß dieses Hämatoprosthetin und nicht das herkömmliche, 34 Kohlenstoffe enthaltende Hämatin die prosthetische Gruppe des Blutfarbstoffs sein müsse. Zum Beweise dieser Auffassung war es nötig, die Überführbarkeit des Hämatoprosthetins in Schälfejew'sches Hämin zu untersuchen, durch

Tabelle I.

Präparat	Substanz mg	N		Substanz mg	CO <sub>2</sub> mg	H <sub>2</sub> O mg	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> mg
		Barometer	Temperatur ° C				
Nr. 16 ( <i>Schalfeis</i> esches Hämin, Mensch)	4,280	728	26	3,470	8,31	1,66	0,442
	4,145	726	25	4,129	11,93	2,07	0,529
Nr. 18 ( <i>Schalfeis</i> esches Hämin, Schwein)	3,892	723	23	4,944	9,67	2,36	0,628
	4,888	723	23	4,016	9,67	1,90	0,522
Nr. 22 ( <i>Schalfeis</i> esches Hämin, Schwein)	4,664	731	21	4,120	9,88	1,95	0,524
	6,630	731	21	5,795	13,94	2,71	0,786
Nr. 48 (OHb, Rind)	3,645	727	21	4,365	10,55	1,94	0,595
	4,245	727	23	4,735	11,42	2,04	0,630
Nr. 65 (COHb, Rind)	3,863	723	20	4,468	10,72	2,04	0,603
	4,542	736	16	4,054	10,77	1,72	0,574
Nr. 14 (C <sub>34</sub> H <sub>33</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> Fe, Rind)	4,839	724	25	4,478	9,38	1,87	0,515
	4,722	724	25	4,319	9,83	1,95	0,547
Nr. 15 (C <sub>34</sub> H <sub>33</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> Fe, Rind)	3,974	731	26	4,097	11,85	2,21	0,646
	4,316	727	25	4,917	12,21	2,19	0,664
Nr. 21 (C <sub>34</sub> H <sub>33</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> Fe, Rind)	4,307	730	23	5,075	12,21	2,19	0,664
	4,160	730	23	3,194	9,09	1,49	0,512
Nr. 35 (C <sub>34</sub> H <sub>33</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> Fe, Rind)	3,852	733	23	3,798	8,59	1,78	0,484
	3,909	733	20	3,577	11,66	2,33	0,561
Nr. 32 (noch unbekannte Zusammensetzung, Pferd)	4,560	731	19	4,157	9,97	1,96	0,483
	4,059	724	19	3,677	9,65	1,80	0,534
Nr. 42 (noch unbekannte Zusammensetzung, Pferd)	4,745	731	22	4,440	10,70	1,90	0,594
	4,173	731	19	4,954	11,91	2,29	0,636
Nr. 43 (noch unbekannte Zusammensetzung, Pferd)	4,707	724	21	4,702	11,28	2,08	0,614
	4,802	724	21	4,121	9,89	1,89	0,569
				3,765	9,04	1,65	0,515

Tabelle II.

Präparat Nr.	C %	H %	N %	Fe %
16	65,45	5,48	9,60	8,93
18	65,74	5,32	9,62	9,06
22	65,50	5,27	9,32	8,89
48	65,85	4,90	9,71	9,42
65	65,66	4,84	9,20	9,37
14	65,21	5,33	9,70	9,25
15	65,60	4,93	10,10	9,17
21	65,38	5,23	9,54	9,32
35	65,50	5,23	9,70	9,32
32	65,69	4,91	9,37	9,34
42	65,50	5,06	9,58	9,05
43	65,51	5,02	9,58	9,63
Mittelwerte . . . . .	65,55	5,13	9,57	9,23
Berechnet für $C_{33}H_{31}N_4O_4Fe$	65,64	5,18	9,30	9,24

*Koppelung des Hämatoprosthetins mit nativem Globin synthetisches Hämoglobin<sup>1</sup> darzustellen und dieses durch Vergleich mit natürlichem Hämoglobin als solches zu identifizieren.*

### C. Überführung des Hämatoprosthetins in Schalfejewsches Hämin.

Durch einfaches Erhitzen mit NaCl und Eisessig unter dem Deckglase war die Substanz nicht in *Teichmannsche* Kristalle überführbar, ebensowenig als ich zu zwei verschiedenen Gelegenheiten größere Mengen der pulverisierten Substanz in Eisessig löste und die filtrierte Lösung in siedenden, mit Kochsalz gesättigten Eisessig einführte. Wohl fielen beim Abkühlen Gebilde aus, doch war deren kristallisierte Natur nicht deutlich zu erkennen und konnten wegen zu geringer Ausbeute nicht analysiert werden. *Die Unmöglichkeit der Darstellung Teichmannscher Kristalle auf diesem Wege steht mit dem Vorhandensein von nur 33 Kohlenstoffen im Hämatoprosthetin in sehr gutem Einklang.*

Verschiedene Versuche ließen es wahrscheinlich erscheinen, daß die Überführung des Hämatoprosthetins in *Schalfejewsches* Hämin bei Gegenwart von Methylalkohol und Eisessig gelingen dürfte. In der Tat fielen, als ich auf Grund der erwähnten Versuche die Substanz in wässrigem, ammoniakalischem Methylalkohol löste und die filtrierte Lösung in die vierfache Menge siedenden, mit Kochsalz gesättigten

<sup>1</sup> „Hämoglobin“ ist in dieser Arbeit als Sammelbegriff für die verschiedenen Hämoglobinmodifikationen zu verstehen.

Eisessigs langsam einführte, beim Abkühlen typische *Teichmannsche* Kristalle aus (Abb. 3). Vorsichtshalber waren aber doch zwei Präparate analysiert worden, die folgendes Ergebnis zeigten.

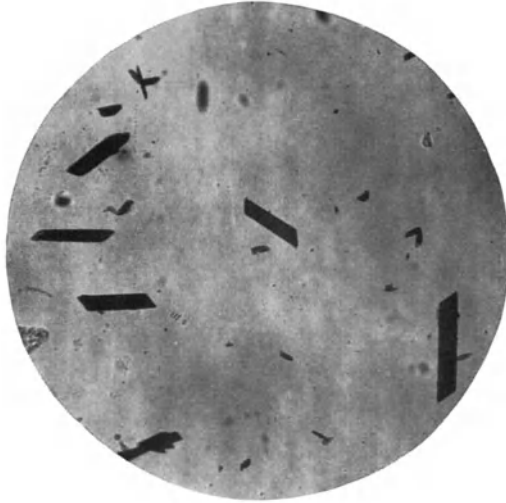


Abb. 3.

*Teichmannsche* Kristalle aus Hämatoprosthethin. Vergr. etwa 400fach.

Tabelle III.

Präparat Nr.	Sub- stanz mg	N			Sub- stanz mg	CO <sub>2</sub> mg	H <sub>2</sub> O mg	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> mg
		Baro- meter	Tempe- ratur °C	ccm				
25	5,329	732	22	0,400	5,046	11,59	2,11	0,609
	4,009	735	21	0,302	4,803	10,99	2,17	0,577
26	4,214	735	22	0,313	4,890	11,18	2,17	0,576
	4,783	735	22	0,342	6,434	14,75	2,96	0,770
					5,223	11,96	2,39	0,627

Chlorbestimmung: Präparat 25: 7,167 mg Substanz erforderten 1,196 ccm n/100 NaOH, 7,405 mg Substanz 1,236 ccm n/100 NaOH. Präparat 26: 7,848 mg Substanz erforderten 1,015 ccm n/100 NaOH, 7,239 mg Substanz 0,935 ccm n/100 NaOH.

Mittelwerte.

Präparat Nr.	C %	H %	N %	Fe %	Cl %
25	62,47	5,04	8,42	8,36	5,92
26	62,49	5,14	8,16	8,39	4,59
Berechnet für C <sub>34</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> FeCl	62,59	4,95	8,64	8,57	5,44



Die Bestimmung des N erfolgte nach *Dumas-Pregl*, die des Chlors nach *Zacherl* und *Krainick*<sup>1</sup>.

Wie also aus der Abbildung und den Analysen hervorgeht, konnte ich das Hämato<sup>o</sup>prosthelin mit 33 Kohlenstoffen bei Gegenwart von Eisessig, Methylalkohol und Chlor in Schälfejewsches Häm<sup>in</sup> überführen. Es besitzt also das Schälfejewsche Häm<sup>in</sup> einen gleichzeitig mit dem Chlor abspaltbaren Kohlenstoff, der bei der Überführung des Hämato<sup>o</sup>prosthelins in Teichmannsche Kristalle wieder zusammen mit Chlor eintritt.

Verschiedene Versuche, bei denen ich an Stelle von Methylalkohol Äthylalkohol benutzt hatte, führten zu keinen Teichmannschen Kristallen. Die Gebilde, die bei diesen Versuchen ausfielen, wurden teils deswegen, weil sie kein einheitliches kristallinisches Bild zeigten, teils wegen der zu geringen Menge, in der sie erhalten wurden, nicht analysiert. Die Tatsache aber, daß die Überführung des Hämato<sup>o</sup>prosthelins in Teichmannsche Kristalle bei Gegenwart von Methylalkohol, nicht aber bei Gegenwart von Äthylalkohol gelingt, scheint darauf hinzuweisen, daß es sich bei dem 34. Kohlenstoff um den Kohlenstoff einer Methylgruppe handelt.

#### D. Koppelung des Hämato<sup>o</sup>prosthelins mit nativem Globin.

*Darstellung des nativen Globins.* Das native Globin stellte ich in Anlehnung an eine Methode dar, die *St. Simonovits* im hiesigen Institut bei bisher noch unveröffentlichten Versuchen benutzte und die ich für meine Zwecke modifizierte. Ich löste 20 bis 25 g des abgenutzten Kristallkuchens von O<sup>H</sup>b, das nach *R. Willstätter* und *A. Pollinger* dargestellt worden war, in 400 ccm Wasser und verarbeitete diese Lösung in zwei Teilen zu je 200 ccm. Ich ging also, da der abgenutzte Kristallkuchen noch etwa 50 % Wasser enthält, von einer etwa 2½%igen Lösung aus. Nach Abkühlen auf 0° C spaltete ich die Oxyhämoglobinlösung in einem Scheidetrichter durch langsamen Zusatz von 5 bis 10 ccm n HCl, wobei ich die Spaltung spektroskopisch kontrollierte. Sobald die Oxyhämoglobinstreifen verschwunden und der Streifen des sauren Häm<sup>at</sup>ins im Rot sichtbar geworden war, schüttelte ich die gespaltene Farbstofflösung mit eisgekühltem Äther aus und fügte nach dem Schütteln ein wenig eisgekühlten Alkohol zu, um eine bessere Schichtung des Äthers von der wässerigen Phase zu erreichen. Das Ausschütteln mit immer wieder frischem, eisgekühltem Äther wiederholte ich so lange, bis dieser keinen Farbstoff mehr aufnahm. Nun wurde die wässerige, das Globin enthaltende Schicht zentrifugiert, wobei sich ziemlich viel Äther von ihr trennte und abgegossen werden konnte. Die restlichen Äthermengen wurden dann im Luftstrom entfernt. Bei dem nun erfolgten vorsichtigen Neutralisieren mit n NaOH (unter dauerndem Umrühren und Umgießen) fielen bald große Flocken denaturierten Globins aus, die die restlichen, nicht mehr ausschüttelbaren Farbstoffmengen mit sich rissen. Sobald mir die Kontrolle mit Lackmuspapier die Nähe des Neutralpunktes anzeigte, unterbrach ich die weitere Zugabe von n NaOH, zentrifugierte die ausgefallenen, schmutzigenbraunen denaturierten Globinmengen ab und

<sup>1</sup> *M. K. Zacherl* u. *H. G. Krainick*, Mikrochem. 11, 62, 1932.

erhielt so eine meist noch etwas trübe Lösung, die in dicker Schicht eine gelbe Farbe zeigte. In dieser Lösung löste ich dann pro 400 ccm ungefähr  $\frac{1}{2}$  g Dinatriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ) auf, um so eine praktisch neutrale Lösung zu erreichen, und ließ die Globinlösung sodann einige Stunden, meist über Nacht, im Eisschrank stehen. Dabei trübte sich in der Regel bald die Lösung und es fielen bald Flocken von denaturiertem Globin aus, die jetzt weiß gefärbt waren und sich bis zum nächsten Tage am Boden des Gefäßes angesammelt hatten. Nach neuerlichem Zentrifugieren erhielt ich jetzt immer eine in dicker Schicht gelbe, klare Lösung, die dann filtriert und zur Synthese mit Farbstoff benutzt wurde. Bemerkte sei, daß ich die Darstellung des Globins bei einer Umgebungstemperatur von unter  $5^\circ \text{C}$ , meist aber unter  $0^\circ \text{C}$  vornahm (im Winter im ungeheizten Zimmer bei offenem Fenster).

Da die an sich geeignete Lösung des Hämatoprosthetins in wässrigem, ammoniakalischem Methylalkohol — in dieser Lösung ist der Farbstoff haltbar — verschiedener Bedenken wegen zur Koppelung mit nativem Globin nicht verwendet werden konnte, desgleichen auch die Lösung in verdünnter Lauge, weil hier sowohl eine Denaturierung des Globins als auch eine Veränderung des Farbstoffmoleküls befürchtet werden mußte, schüttelte ich fein pulverisiertes Hämatoprosthetin in destilliertem Wasser, fügte dann unter abermals kräftigem Schütteln einige Tropfen 5%iger Sodalösung zu (auf 20 ccm Farbstofflösung etwa 6 bis 8 Tropfen) und gelangte so zu einer konzentrierten Lösung, die nach Filtrieren zur Koppelung mit nativem Globin verwendet wurde. (Die Lösung muß frisch bereitet werden.)

Die filtrierte Lösung des Hämatoprosthetins wird in die unter  $5^\circ \text{C}$  gekühlte Globinlösung unter dauerndem Umrühren langsam eingeführt. Wenn sich die Globinlösung hierbei nicht trübt und die geringe Alkalität der Farbstofflösung durch die in der Lösung vorhandenen Phosphate kompensiert wird, so erscheint das *Spektrum des Methämoglobins in neutraler Lösung*, kenntlich an seinem Streifen im Rot. Nun wird durch vorsichtige Zugabe von 5%iger Sodalösung in kleinen Mengen schwach alkalisch gemacht, wobei das *Spektrum des Methämoglobins in neutraler Lösung in das des Methämoglobins in alkalischer Lösung übergeht*. Um das ganze vorhandene Globin mit Farbstoff zu binden, wird Farbstofflösung im Überschuß zugegeben, und ein solcher Überschuß ist im Spektrum des Methämoglobins in alkalischer Lösung gut zu erkennen. *Dieses Methämoglobin in alkalischer Lösung wird durch Zusatz von Natriumhydrosulfit reduziert, und es erscheint jetzt der Streifen des reduzierten Hämoglobins* (hat man unvorsichtigerweise zu stark alkalisch gemacht, so entsteht ein Gemisch von reduziertem Hämoglobin und Globinhämochromogen). In diese Lösung von reduziertem Hämoglobin wird jetzt langsam unter Umrühren CO-Gas oder Sauerstoff eingeleitet, wobei *das Spektrum des COHb sehr bald, das des OHb aber erst nach geraumer Zeit erscheint*.

Das CO-Gas gewann ich in der Weise, daß ich 80%ige Ameisensäure langsam in konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  einführte und das entstandene CO-Gas vor dem Einleiten in die Lösung des reduzierten Hämoglobins durch eine Wasch-

flasche mit verdünnter NaOH perlen ließ. Da während der Reduktion mit Natriumhydrosulfit, desgleichen bei dem folgenden Einleiten von Sauerstoff, saure Produkte entstehen, durch die das Hämoglobin denaturiert und in Flocken ausgefällt werden könnte, muß man die Reaktion der Lösung dauernd kontrollieren und nach Bedarf Sodalösung bis zu dauernd schwach alkalischer Reaktion jeweils in kleinen Mengen zuführen. Die Kontrolle der Reaktion führte ich aus, indem ich destilliertes Wasser mit einigen Tropfen einer alkoholischen Phenolphthaleinlösung versetzte und jedesmal je einen Tropfen dieser Lösung und der Hb-Lösung in der bekannten Art auf einer weißen Porzellanplatte zusammenfließen ließ. Eine ganz schwache Rosafärbung gab die richtige schwach-alkalische Reaktion an.

Nach Unterbrechen der Einleitung von CO-Gas bzw. Sauerstoff neutralisierte ich die schwach alkalische COHb- bzw. OHb-Lösung mit einer Lösung von primärem Kaliumphosphat (18,156 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf 1 Liter destillierten Wassers) und salzte sodann mit Ammonsulfat aus. Das ausgesalzte COHb bzw. OHb nutschte ich in kleinen Mengen ab und löste es in destilliertem Wasser von 34° C. Da ein Teil des Hämoglobins immer denaturiert und wasserunlöslich ist, muß vom unlöslichen Teile abfiltriert werden. Dieser Rückstand enthält auch den überschüssigen, in destilliertem Wasser unlöslichen Farbstoff. Nicht denaturiertes Hämoglobin wird aus dem Rückstande so lange herausgelöst, bis sich das Lösungswasser nicht mehr färbt. Durch nochmaliges Aussalzen mit Ammonsulfat, Abnutschen und Wiederlösen gelingt es dann, eine konzentrierte Lösung darzustellen, die beim abermaligen Filtrieren nunmehr einen ganz geringen Rückstand hinterließ.

#### E. Identifizierung des Koppelungsproduktes als Kohlenoxyd-, Met- bzw. Oxyhämoglobin.

Die spektrophotometrischen Untersuchungen der synthetischen Hämoglobinlösungen führte ich mittels eines nach *Martens* und *Grünbaum* modifizierten Spektrophotometers aus. Als Lichtquelle diente eine Metallfadenglühlampe, der Objektivspalt war auf 0,1 mm Breite eingestellt, der Okularspalt umfaßte jeweils ein Spektralbereich, dessen Breite im Rot etwa 15  $\mu\mu$ , im Blau 5  $\mu\mu$  betrug.

Da ich von der Konzentrationsbestimmung der synthetischen Hämoglobinlösungen aus verschiedenen Gründen Abstand genommen habe, konnte ich auch die spezifischen Extinktionskoeffizienten nicht berechnen. Um aber dennoch die von mir an synthetischen Lösungen festgestellten Werte mit den an denselben natürlichen Hämoglobinmodifikationen und zwar von *P. Hári* am Oxyhämoglobin<sup>1</sup> und Methämoglobin<sup>2</sup>, und von *V. Sebesta*<sup>3</sup> am Kohlenoxydhämoglobin gefundenen Werten vergleichen zu können, habe ich das Verhältnis zwischen den von den genannten Autoren an der ersten *Hüfnerschen* Stelle (560,8) und dem von mir an der gleichen Stelle gefundenen Extinktionskoeffizienten berechnet und auf Grund dieses Verhältnisses alle meine übrigen Werte umgerechnet. Die in dieser Weise umgerechneten Werte der Lichtabsorption je einer Lösung von synthetischem Kohlenoxydhämoglobin, Methämoglobin in neutraler<sup>4</sup> und alkalischer Lösung habe ich in ein Ordinatensystem eingezeichnet und

<sup>1</sup> *P. Hári*, diese Zeitschr. 82, 229, 1917.

<sup>2</sup> *Derselbe*, ebenda 103, 271, 1919.

<sup>3</sup> *V. Sebesta*, ebenda 260, 187, 1933.

zwecks Vergleichs die entsprechenden von *P. Hári* und *V. Sebesta* an denselben, aber natürlichen Hämoglobinmodifikationen gefundenen Lichtabsorptionskurven, und zwar auf den Abszissen die Wellenlänge und auf den Ordinaten die Extinktionskoeffizienten eingetragen. Um aber ein Zusammenfallen der beiden Kurven zu vermeiden und dennoch ihren gleichsinnigen Verlauf demonstrieren zu können, habe ich die Lichtabsorptionskurve der synthetischen Lösungen in der Weise verschoben, daß jeweils die obere die der synthetischen Hämoglobinmodifikation, die untere aber die an natürlichen Lösungen gefundene Vergleichskurve darstellt.

Bermerkt sei, daß bei den hier spektrophotometrisch untersuchten Lösungen der verschiedenen, synthetischen Hämoglobinmodifikationen das Globin vom Pferde und das Hämato prosthetin vom Rinde stammt.

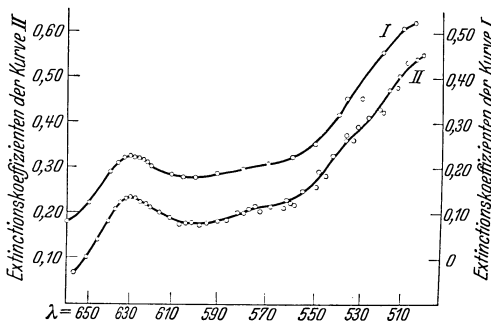


Abb. 4.

Kurve I: Synthetisches Methämoglobin in neutraler Lösung.

Kurve II: Natürliches Methämoglobin in neutraler Lösung (*P. Hári*).

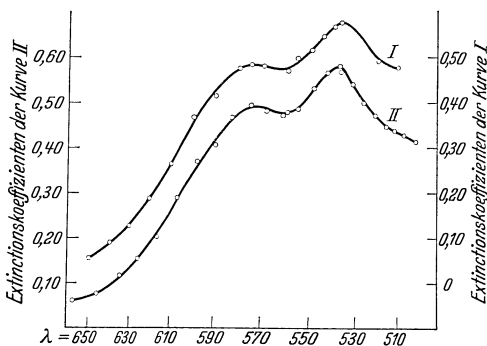


Abb. 5.

Kurve I: Synthetisches Methämoglobin in alkalischer Lösung.

Kurve II: Natürliches Methämoglobin in alkalischer Lösung (*P. Hári*).

Die Kurve von Methämoglobin in neutraler Lösung (Abb. 4) entstammt einer ursprünglichen Lösung von synthetischem Oxyhämoglobin, die durch vorsichtigen Zusatz von Ferricyankali in Methämoglobin überführt worden war, die Kurve des Methämoglobins in alkalischer Lösung (Abbildung 5) dem synthetischen Produkt nach der Koppelung, Alkalisierung und vor der Reduktion, und die Kurve des synthetischen COHb (Abb. 6), einer Lösung, die in der eben beschriebenen Weise dargestellt und vor der spektrophotometrischen Untersuchung nochmals mit CO-Gas gesättigt worden war.

*Es stimmen also die Lichtabsorptionskurven der synthetischen Lösungen von Methämoglobin mit den an natür-*

lichen Lösungen gefundenen vorzüglich überein. Dasselbe kann auch von der Lichtabsorptionskurve des synthetischen COHb gesagt werden, denn die beiden Punkte bei 585 und 577  $\mu\mu$ , an denen die beiden Kurven abweichen, sind von Frl. Sebesta nachträglich bestimmt worden. Ich darf also wohl

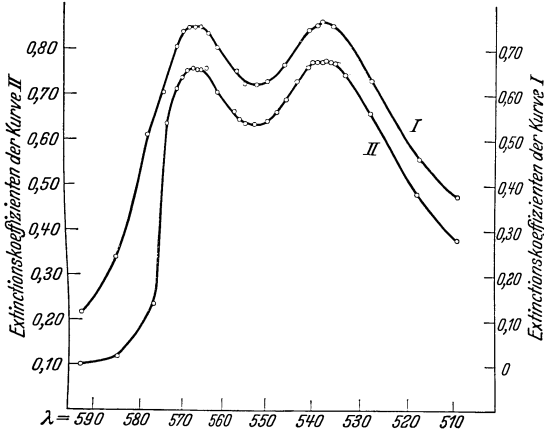


Abb. 6.

Kurve I: Synthetisches COHb.    Kurve II: Natürliches COHb (V. Sebesta).

mit Sicherheit schließen, daß es sich bei meinen synthetischen Lösungen um die entsprechenden Modifikationen von Hämoglobin handelt. Aus der Reihenfolge der Darstellung der synthetischen Hämoglobinmodifikationen ergibt sich aber auch, daß das Hämato prosthetin jene Form der eisenhaltigen Komponente darstellt, wie sie in der stabilen Form des Hämoglobins, also dem Methämoglobin vorhanden ist, das dann reduziert Sauerstoff und Kohlenoxyd bindet. Diese Auffassungen stimmen auch mit der derzeitigen Auffassung von  $Fe^{+++}$  im Methämoglobin und  $Fe^{++}$  im Oxyhämoglobin sehr gut überein.

In der Tabelle IV habe ich weiterhin die an verschiedenen synthetischen Lösungen gefundenen Hüfnerschen Quotienten, die für jede Hämoglobinmodifikation einen charakteristischen Wert darstellen, und zum Vergleich die verlangten angegeben.

Tabelle IV.

	Kohlenoxyd- hämoglobin	Methämoglobin in neutraler Lösung	Methämoglobin in alkalischer Lösung
Einzelwerte synthetischer Lösungen	1,08 1,10 1,09	1,57 1,59 1,51	1,21 1,22
Gefundener Mittelwert an natürlichen Lösungen . . . . .	1,10	1,58	1,20

*Es zeigen also auch die Hüfnerschen Quotienten ein ideales Übereinstimmen mit den an natürlichen Präparaten gefundenen Werten.*

Auf die graphische Darstellung der Lichtabsorption synthetischer Lösungen von Oxyhämoglobin habe ich verzichtet, weil nach der angegebenen Methode der Darstellung immer nur Lösungen erhalten werden, die mehr oder weniger mit Methämoglobin gemischt sind; es zeigten die von mir erhaltenen Lösungen daher sowohl die beiden Streifen des OHb als auch in konzentrierter Lösung den Streifen des Methämoglobins in neutraler Lösung in Rot.

#### **F. Darstellung Teichmannscher Kristalle aus synthetischem Hämoglobin.**

Da das Hämatoprosthetin durch Erhitzen mit NaCl und Eisessig allein nicht in *Teichmannsche* Kristalle überführt werden konnte, die Lichtabsorption der mit Hämatoprosthetin synthetisierten Hämoglobinmodifikationen aber mit der an den entsprechenden natürlichen Lösungen gefundenen übereinstimmte, mußte der Darstellung *Teichmannscher Kristalle aus synthetischem Hämoglobin durch Erhitzen mit NaCl und Eisessig, also ohne Gegenwart von Methylalkohol, entscheidende Bedeutung* zukommen.

Bei dem ersten Versuch der Darstellung *Teichmannscher Kristalle* aus synthetischem Hämoglobin hatte sich die *Gegenwart von Ammonsulfat störend* erwiesen. Es wurde daher in der Folge synthetische

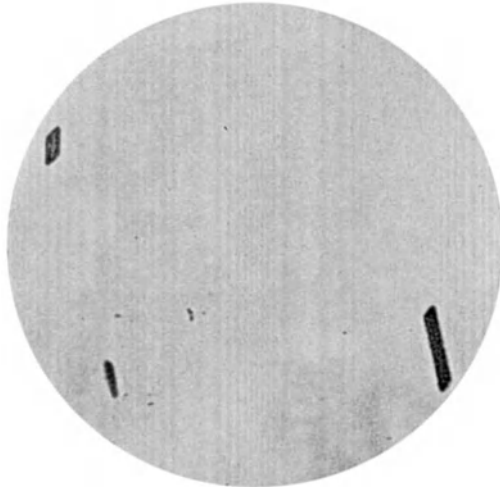


Abb. 7.

*Teichmannsche Kristalle aus synthetischem COHb. Vergr. etwa 600fach.*

COHb-Lösung durch zweimaliges Aussalzen mit Ammonsulfat und Wiederlösen in destilliertem Wasser einkonzentriert und diese konzentrierte Lösung einige Tage gegen fließendes Leitungswasser dialysiert.

Um die letzten Reste von Ammonsulfat zu entfernen, wurde die verwendete Lösung von synthetischen COHb schließlich in der Hitze koaguliert und mit destilliertem Wasser (bis die Bariumchloridprobe negativ ausfiel) ausgewaschen. Das so gereinigte Koagulum führte ich, in etwas destilliertem Wasser aufgeschwemmt, in siedenden, mit Kochsalz gesättigten Eisessig ein, worauf beim Abkühlen *typische Teichmannsche Kristalle* ausfielen. Der Versuch war dreimal mit synthetischem COHb, das als Hämatoprosthetin die Reste der analysierten Präparate 14, 16 und 65 enthielt, mit dem gleichen Ergebnis wiederholt worden. Die in der Abb. 7 wiedergegebenen Kristalle entstammen einem dieser Präparate *Teichmannscher* Kristalle, das mit Pyridin-Chloroform-Eisessig in der üblichen Methode umkristallisiert worden war.

(Bemerkt sei, daß diese abgebildeten *Teichmannschen* Kristalle folgenden Kreislauf absolviert haben: Es waren ursprünglich *Teichmannsche* Kristalle aus Oxyhämoglobin dargestellt worden, diese waren in Hämatoprosthetin überführt (Präparat 16) und letzteres mit nativem Globin zu COHb gekoppelt worden, das einen *Hüfnerschen* Quotienten von 1,09 ergeben hatte. Aus diesem synthetischen COHb waren jetzt neuerdings wieder *Teichmannsche* Kristalle gewonnen worden.)

### G. Betrachtung der Literatur.

Auf Grund der Analysenergebnisse verschiedener Forscher, wie *Nencki* und *Zaleski*<sup>1</sup> und vorwiegend *Küster*<sup>2</sup>, ist das *nach Schalfejew dargestellte Hämin als eine Verbindung mit 34 Kohlenstoffen* erkannt worden. Im Gegensatz zu letzterem zeigen nun aber das *Hämatoporphyrin und seine Abkömmlinge Kohlenstoffwerte*, die mit ganz wenigen Ausnahmen auf 33 Kohlenstoffe im Molekül hinweisen bzw. sich von 33 Kohlenstoffen ableiten. Diese Verhältnisse gehen aus der folgenden Zusammenstellung von Kohlenstoffwerten verschiedener Autoren klar hervor:

Beim *Hämatoporphyrin* wurde gefunden von *Nencki* und *Sieber*<sup>3</sup>: 66,84, 67,16, 66,98 und 66,85; von *H. Fischer*<sup>4</sup>: 67,20; von *W. Küster*: 68,63† und 67,73††; von *R. Willstätter* und *M. Fischer*<sup>5</sup>: 66,73, 66,60, 67,09, 66,80, 67,04, 67,14 und 67,22 % C.

Berechnet für  $C_{33}H_{38}N_4O_6$ : 67,54\*, für  $C_{34}H_{38}N_4O_6$ : 68,19 % C\*.

Beim *Chlorhydrat des Hämatoporphyrins* wurde gefunden von *Nencki* und *Sieber*<sup>3</sup>: 59,80, 59,79 und 59,57; von *H. Fischer*<sup>4</sup>: 59,50 und 60,64 und von *R. Willstätter* und *M. Fischer*<sup>5</sup>: 60,64 % C.

<sup>1</sup> *Nencki*, *M.* u. *J. Zaleski*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 384, 1900.

<sup>2</sup> *W. Küster*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 29, 822, 1896; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 12, 1899; 40, 391, 1903/04.

<sup>3</sup> *Nencki* u. *Sieber* zit. nach *R. Willstätter* u. *M. Fischer*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 463, 1913.

<sup>4</sup> *H. Fischer*, *E. Bartholomäus* u. *H. Röse*, ebenda 84, 281, 1913.

† *W. Küster*, Chem. Ber. 45, 1941, 1912.

†† *W. Küster* u. *W. v. Degenfeld*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 180, 266, 1929.

<sup>5</sup> *R. Willstätter* u. *M. Fischer*, ebenda 87, 426, 463, 465, 474, 486, 492, 1913.

Berechnet für  $C_{33}H_{40}N_4O_4Cl_2$ : 60,07\*, für  $C_{34}H_{40}N_4O_4Cl_2$ : 60,81% C\*.

Beim *Dimethylester des Hämatoporphyrins* wurde gefunden von *R. Willstätter* und *M. Fischer*<sup>1</sup>: 68,31 und 68,26% C.

Berechnet für  $C_{35}H_{42}N_4O_6$ : 68,36\*, für  $C_{36}H_{42}N_4O_6$ : 69,12% C\*.

Beim *Hämoporphyrin* wurde gefunden von *R. Willstätter* und *M. Fischer*<sup>1</sup>: 71,48, 71,42, 71,63, 71,68 und 71,76% C.

Berechnet für  $C_{33}H_{36}N_4O_4$ : 71,70\*, für  $C_{34}H_{36}N_4O_4$ : 72,31% C\*\*\*.

Beim *Mesoporphyrin* wurde gefunden von *R. Willstätter* und *M. Fischer*<sup>1</sup>: 71,87 und 72,00% C.

Berechnet für  $C_{33}H_{38}N_4O_4$ : 71,74\*, für  $C_{34}H_{38}N_4O_4$ : 72,04% C\*\*\*.

Beim *Actiomesoporphyrin* wurde gefunden von *O. Schumm*<sup>2</sup>: 79,86, 79,60, 79,61, 80,09, 79,63, 79,78, 79,29% C.

Berechnet für  $C_{31}H_{38}N_4$ : 79,76\*\*\*, für  $C_{32}H_{38}N_4$ : 80,28% C\*\*.

\* Berechnet von *Willstätter* und *Fischer*, \*\* berechnet von *Schumm*, \*\*\* berechnet von mir.

Da nach der bisherigen Auffassung, daß das Chlor im *Schalfejewischen* Hämin an das Eisen gebunden sei und bei der Porphyrindarstellung zusammen mit letzterem abgespalten werde, diese bei den Porphyrinen gefundenen und in bezug auf das Hämin zu tiefen C-Werte nicht verständlich erschienen, folgerten *Willstätter* und *Fischer*<sup>1</sup>, daß man, gestützt auf die Porphyrinanalysen dem *Schalfejewischen* Hämin auch 33 C-Atome zuzusprechen müsse und die Diskrepanz im Kohlenstoff zwischen Hämin und Porphyrin darauf zurückzuführen sei, daß man pro Analyse zwischen  $C_{33}$  und  $C_{34}$  nicht sicher entscheiden könne. Die beiden Autoren stützten ihre Auffassung mit der Anführung eines Kohlenstoffmittelwertes von 16 Hämatinanalysen *Küsters*<sup>3</sup>, der zwischen den für  $C_{34}$  und  $C_{33}$  berechneten Werten, letzterem allerdings näher liegt. Aus eigenen Versuchen, deren Veröffentlichung folgen wird, glaube ich aber die Ursache dieser beim Hämatin gefundenen zu tiefen Kohlenstoffwerte entnehmen zu können und kann aus diesem Grunde für das *Schalfejewische* Hämin nur die an letzterem direkt gefundenen C-Werte als beweisend betrachten, die aber fast ausnahmslos auf 34 Kohlenstoffe lauten. Anscheinend von der Annahme ausgehend, daß Feuchtigkeitsgehalt die tieferen C-Werte beim Hämatoporphyrin verursache, versuchten *Fischer*, *Treibs* und *Hummel*<sup>4</sup> in einer 1929 erschienenen Arbeit, durch Trocknen der Hämatoporphyrinpräparate bei 50° C ihren C-Gehalt mit dem für eine Formel mit 34 C-Atomen in Einklang zu bringen. Es liegt zwar von *Willstätter* und *Fischer*<sup>5</sup> die Angabe vor, daß man Hämatoporphyrin nur im Vakuum trocknen dürfe, da es sich beim Erwärmen durch Abgabe von Wassermolekülen verändert, so konnten dennoch *Fischer* und Mitarbeiter die verlangten C-Werte bei ihren Versuchen nicht erreichen. So sagen die Autoren selbst: „Zwar konstatieren wir auch hier noch ein unerfreuliches Defizit im Kohlenstoff, jedoch ist zu bemerken, daß bei den Analysenzahlen des Hämatoporphyrins durchwegs der Kohlenstoff zu niedrig gefunden wird, ohne daß die Ursache dafür bekannt ist.“ In einer

<sup>1</sup> *R. Willstätter* u. *M. Fischer*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 426, 463, 465, 474, 486, 492, 1913.

<sup>2</sup> *O. Schumm*, ebenda 185, 81, 1929; 181, 157, 159, 160, 1929.

<sup>3</sup> *W. Küster*, ebenda 40, 415, 1903/04.

<sup>4</sup> *H. Fischer*, *A. Treibs* u. *G. Hummel*, ebenda 185, 33, 1929.

<sup>5</sup> *R. Willstätter* u. *M. Fischer*, ebenda 87, 466, 1913.



Arbeit über das Hämoporphyrin aus dem Jahre 1930 versuchte *Fischer* zusammen mit *Hellberger* und *Hummel*<sup>1</sup> nachzuweisen, daß das Hämoporphyrin ein Gemisch von Mesoporphyrin, Deuteroporphyrin und den zwei Tetramethyl-, monoäthyl-, dipropionsäureporphinen A und B darstellt, welche letztere sich vom Aetioporphyrin ableiten sollen. Es würde sich somit beim Hämoporphyrin und dem daraus gewonnenen Aetioporphyrin das Kohlenstoffdefizit erklären. *Fischer* berechnet für Mesoester 72,69, für A- und B-Ester 72,05 und für Deuteroester 71,34 % C. Ein dargestelltes Präparat ergab 72,38 % C und zeigte einen Schmelzpunkt bei 175° C. Durch fraktionierte Umkristallisation erhielt *H. Fischer* drei Präparate mit 71,37, 70,92 und 70,73 % C, und Schmelzpunkten von 192, 188 und 175° C. Den Autoren war hier schon aufgefallen, daß jedes dieser durch fraktionierte Umkristallisation erhaltenen Präparate einen etwa 1½ % tieferen C-Gehalt aufweist, als für Mesoester, Deuteroester und A- und B-Ester berechnet worden war. Es scheint mir daher ein Schluß auf Identität der Präparate mit den berechneten Substanzen nicht unangezwungen zu sein, um so eher, als die Schmelzpunkte von zwei Präparaten an der Fehlergrenze liegen. Es hatten ja aber auch die angeführten C-Werte der Präparate von *Schumm* gezeigt, die nicht als Aetiohämoporphyrin, sondern als Aetiomesoporphyrin aufzufassen sind (sie waren teils aus Mesoporphyrin, teils aus Hämin dargestellt worden), daß sie besser mit einer Formel mit 31 Kohlenstoffen als mit einer solchen mit 32 Kohlenstoffen zu vereinbaren sind.

Daß nun aber dem Aetioporphyrin 31, und dem Proto- und Mesoporphyrin 33 C-Atome zukommen, zeigt sich auch bei den Hämpräparaten *H. Fischers*, die doch auf dieselbe Kohlenstoffzahl lauten müssen, wie die entsprechenden Porphyrine. So fanden *H. Fischer*, *A. Treibs* und *K. Zeile*<sup>2</sup> beim Aetiohäm 70,22 und 70,91 % C (berechnet für  $C_{32}H_{36}N_4Fe$  72,16, für  $C_{31}H_{36}N_4Fe$  71,51 % C), beim Protohäm 66,78, 65,71 und 65,28 % C (berechnet für  $C_{34}H_{32}N_4O_4Fe$  66,23, für  $C_{33}H_{32}N_4O_4Fe$  65,54 % C), beim Mesohäm 65,58 % C (berechnet für  $C_{34}H_{36}N_4O_4Fe$  65,80, für  $C_{33}H_{36}N_4O_4Fe$  65,11 % C) und beim Mesoesterhäm 65,19 und 65,63 % C (berechnet für  $C_{36}H_{40}N_4O_4Fe$  66,65 und für  $C_{35}H_{40}N_4O_4Fe$  66,02 % C).

Die Formeln mit  $C_{32}$  bzw.  $C_{34}$  wurden von den genannten Autoren, die Formeln mit  $C_{31}$  bzw.  $C_{33}$  von mir berechnet.

Mit Ausnahme des einzigen Wertes von Mesohäm und des ersten Präparates von Protohäm, das auch einen für 34 C-Atome zu hohen prozentualen Wert aufweist, entsprechen die Analysen den bei den Porphyrinen gefundenen Werten. Von *Willstätter* und *Fischer* wurde die Auffassung vertreten, daß die Analyse nicht genau zwischen  $C_{33}$  und  $C_{34}$  entscheiden lasse<sup>3</sup>. Dieser Einwand mag für Einzelanalysen volle Berechtigung haben, kann aber hier nicht gelten, wo die Zusammenstellung einer großen Zahl von Analysen ein ganz eindeutiges Bild liefert. Wie wäre es sonst zu verstehen, daß beim Aetioporphyrin immer 31, bei den anderen in Frage stehenden Porphyrinen immer 33, beim Schälfejewschen Hämin immer 34 C-Atome gefunden werden? So fanden bei letzterem *Nencki* und *Zaleski*<sup>4</sup> 62,58,

<sup>1</sup> *H. Fischer*, *H. Hellberger* u. *G. Hummel*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **191**, 257, 1930.

<sup>2</sup> *H. Fischer*, *A. Treibs* u. *K. Zeile*, ebenda **195**, 1, 1931.

<sup>3</sup> *R. Willstätter* u. *M. Fischer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**, 426, 1913.

<sup>4</sup> *M. Nencki* u. *J. Zaleski*, ebenda **30**, 394, 1900.

62,43 und 62,52 % C, *Hepter* und *Marchlewski*<sup>1</sup> 62,35, 62,65 und 62,34 % C, *W. Küster*<sup>2</sup> 62,29, 62,48 und 62,25 % C; 62,64, 62,46, 62,17 und 62,35 % C; 62,51, 62,52 und 62,64 % C; und ich 62,47\*, 62,49\*, 62,62\*\* und 62,42 % C\*\*.

Die Formel  $C_{34}H_{32}N_4O_4FeCl$  verlangt 62,59 % C.

\* In dieser Arbeit veröffentlichte Präparate, \*\* noch nicht veröffentlichte Präparate.

Besäße das *Schalfejewsche* Hämin nur 33 C-Atome, dann wäre ein prozentualer C-Wert von 61,78 % zu erwarten. *Es zwingen vielmehr die Analysenergebnisse der Literatur zu dem Schluß, daß den einzelnen Verbindungen jene Zahl von C-Atomen zukommt, die sich aus den Analysen ergibt.*

#### H. Besprechung der Versuchsergebnisse.

Aus der vorliegenden Arbeit geht eindeutig hervor, daß nicht das *Hämatin* von der Zusammensetzung  $C_{34}H_{33}N_4O_5Fe$  die *prothetische Gruppe* des Blutfarbstoffs darstellt, sondern als solche das *Hämatoprothetin* von der empirischen Formel  $C_{33}H_{31}N_4O_4Fe$  anzusprechen ist. Die Berechtigung dieser Auffassung ergibt sich:

1. Aus der Tatsache, daß ich aus *Schalfejewschen* Hämin und anderen Derivaten der prothetischen Gruppe mit Hilfe immer der gleichen Methode zu ein und derselben Kernsubstanz, dem *Hämatoprothetin*, gelangt bin.

2. Aus der direkten kristallinen Isolierung des *Hämatoprothetins* aus *Oxyhämoglobin* und *Kohlenoxydhämoglobin*.

3. Aus der Koppelung des *Hämatoprothetins* mit nativem Globin zu den verschiedenen *Hämoglobinmodifikationen*.

4. Aus der Darstellung *Teichmannscher* Kristalle aus diesem synthetisierten Hämoglobin durch Erhitzen mit NaCl und Eisessig. Da nun aber das synthetische Hämoglobin als eisenhaltige Komponente das *Hämatoprothetin* mit 33 Kohlenstoffen enthält, *Teichmannschen* Kristallen aber 34 C-Atome zukommen, fühle ich mich zu dem Schluß berechtigt, daß die *Teichmannschen* Kristalle ein Derivat der prothetischen Gruppe darstellen, das sich von letzterer außer durch das Vorhandensein von Chlor auch noch durch den Mehrbesitz des 34. Kohlenstoffs unterscheidet. Da sich aus der Darstellungsmethode *Teichmannscher* Kristalle aus Hämoglobin keine andere Möglichkeit erkennen läßt und *Hämatoprothetin* durch Erhitzen mit NaCl und Eisessig ohne Gegenwart von Methylalkohol nicht in *Teichmannsche* Kristalle überführt werden konnte, kann dieser 34. Kohlenstoff des *Schalfejewschen* Hämins nur aus dem Globin stammen. Es scheint daher die Spaltung des Hämoglobins bei der Darstellung *Teichmannscher* Kristalle in der Weise vor sich zu gehen, daß ein Kohlenstoff des Globins an die prothetische Gruppe gebunden bleibt.

Die Isolierung des *Hämatoprothetins* und die Aufdeckung seines Verhältnisses zum *Schalfejewschen* Hämin, das in der Abspaltung und Wiedereinführung des 34. Kohlenstoffs zum Ausdruck kommt, läßt die Analysenergebnisse der Literatur erst verständlich erscheinen. Die Überführung von *Schalfejewschem* Hämin in *Hämatoporphyrin* vollzieht sich eben in der Weise, daß außer Eisen und Chlor auch der 34. Kohlenstoff ab-

<sup>1</sup> *J. Hepter* u. *L. Marchlewski*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 38, 1904.

<sup>2</sup> *W. Küster*, ebenda 40, 391, 1904; 28, 12, 1899; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 29, 822, 1896.

gespalten wird, wodurch man eine eisen- und chlorfreie Verbindung mit 33 C-Atomen erhält. Ein Porphyrin mit 33 C-Atomen muß aber decarboxyliert ein Aetioporphyrin mit 31 C-Atomen liefern, wie tatsächlich die Analysen ergeben. Da man aber aus *Schalfejew'schem* Hämin ein Aetioporphyrin mit 31 C-Atomen erhält, so ist auch zu erwarten, daß man aus dem Hämatoprosthetin, bei dem der 34. Kohlenstoff des Hämins zusammen mit dem Chlor abgespalten wurde, ebenfalls zum Hämatoporphyrin mit 33 und Aetioporphyrin mit 31 C-Atomen gelangt.

Es besitzen also *das Schalfejew'sche Hämin 34, das Hämatoprosthetin 33, das Hämatoporphyrin, Protoporphyrin, Mesoporphyrin und Hämoporphyrin ebenfalls 33, das Aetioporphyrin als die gemeinsame Stammsubstanz der prosthetischen Gruppe des Blutfarbstoffes und des Chlorophylls*, wie schon *Willstätter* und *Fischer*<sup>1</sup> feststellten, 31, und die Hämpräparate jene Zahl von Kohlenstoffen, die den betreffenden Porphyrinen entspricht, also *das Aetiohäm 31 und das Proto- und Mesohäm 33 Kohlenstoffe*.

Im Hinblick auf die Abspaltbarkeit des 34. Kohlenstoffes des *Schalfejew'schen* Hämins ist nicht gut vorstellbar, daß dieser in der Konstitutionsformel, die ja übrigens in bezug auf die Zahl der Kohlenstoffe bei allen früher genannten Verbindungen schon wegen ihrer Konstanz auf die Analyseergebnisse Rücksicht nehmen muß, die gleiche Stellung einnehmen soll als andere Seitenketten. Ähnliche Bedenken ergeben sich demnach auch gegenüber dem Aetioporphyrin III *H. Fischer's* und der Bindung des Chlors im *Schalfejew'schen* Hämin, die bisher an das Eisen angenommen wird. Einen eindeutigen Beweis für diese Auffassung konnte ich in der Literatur nicht finden. Vielmehr scheint mir das Chlor im Zusammenhang mit dem 34. Kohlenstoff zu stehen und es würde eine derartige Annahme eine Reihe von Versuchsergebnissen erklären. Aus dem Hämatoprosthetin, in dem das Eisen ebenfalls dreiwertig anzunehmen ist, geht schon hervor, daß zur Absättigung der dritten Valenz des Eisens Chlor, ein anderes Halogen oder entsprechende Atomgruppe nicht notwendig ist.

#### Zusammenfassung.

1. Ich konnte eine neue kristallinische Verbindung, das *Hämatoprosthetin*,  $C_{33}H_{31}N_4O_4Fe$ , beschreiben und dieses aus *Schalfejew'schem* Hämin und anderen Derivaten der prosthetischen Gruppe und auch aus *Oxyhämoglobin* und *Kohlenoxydhämoglobin* direkt darstellen.

2. Das Hämatoprosthetin ließ sich durch Erhitzen mit *NaCl* und *Eisessig* bei Gegenwart von *Methylalkohol*, nicht aber ohne *Methylalkohol* in *Teichmann'sche* Kristalle überführen.

3. Durch Koppelung des Hämatoprosthetins mit nativem Globin konnte ich die verschiedenen *Hämoglobinmodifikationen* erhalten, von denen ich einige spektrophotometrisch untersuchte und deren *Lichtabsorptionskurve* mit der an den entsprechenden natürlichen *Hämoglobinmodifikationen* gefundenen übereinstimmte.

<sup>1</sup> *R. Willstätter* u. *M. Fischer*, Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 494, 1913.

4. Aus *synthetischem Hämoglobin (COHb)* konnte ich *durch Erhitzen mit NaCl und Eisessig* ohne Gegenwart von Methylalkohol *Teichmannsche Kristalle erhalten.*

5. Es kann hiermit als begründet gelten, *daß nicht das Hämatin  $C_{34}H_{33}N_4O_5Fe$ , sondern das Hämatoprosthetin die prosthetische Gruppe des Blutfarbstoffs darstellt* und daß *bei der Darstellung Teichmannscher Kristalle aus Hämoglobin ein der prosthetischen Komponente nicht zugehöriger, anscheinend dem Globin entstammender Kohlenstoff an die prosthetische Gruppe gebunden bleibt.*

6. Es konnte weiterhin die Auffassung erhärtet werden, daß *das Schälfejewsche Hämin 34 Kohlenstoffe besitzt*, und aus den Analysen verschiedener Forscher festgestellt werden, daß *dem Hämatoporphyrin, Mesoporphyrin, Protoporphyrin, Hämaporphyrin und den diesen entsprechenden Hämen 33 und dem Aetioporphyrin und Aetiohäm 31 C-Atome zukommen.*

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle *weiland Prof. Paul Hári* in dankbarer Weise zu gedenken, der mir die Ausführung der Arbeit an seinem Institut gestattete und den Fortgang der Arbeit bis zu seinem Tode mit großem Interesse verfolgte.

## Über kristallisiertes synthetisches Kohlenoxydhämoglobin.

Von  
Alfred Herzog.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 7. Juli 1933.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Im Anschluß an die Darstellung synthetischen Hämoglobins, das ich in der vorhergehenden Mitteilung<sup>1</sup> beschrieben habe, mußte es natürlich von Interesse sein, festzustellen, ob dieses synthetische Hämoglobin kristallisationsfähig ist.

Verschiedene Versuche, die ich mit synthetischem Oxyhämoglobin ausführte, hatten ein negatives Ergebnis, doch waren meine Lösungen synthetischen Oxyhämoglobins immer mehr oder weniger mit Methämoglobin gemischt, von dem ja bekannt ist, daß es sich wegen seiner Leichtlöslichkeit in destilliertem Wasser und verdünntem Alkohol nur äußerst schwer auskristallisieren läßt<sup>2</sup>. Hingegen war es mir gelungen, bei synthetischem COHb, von dem ich ja reine Lösungen erhalten hatte, teils durch Verwendung von Ammonsulfat, teils durch Alkoholzusatz Kristallisation zu erzielen. Bei der Kristallisation mit Ammonsulfat ging ich in der Weise vor, daß ich die Lösung von synthetischem Kohlenoxydhämoglobin durch zweimaliges Aussalzen und Wiederlösen in destilliertem Wasser von 34° C möglichst einkonzentrierte, zur filtrierten Lösung immer nach Verlauf einiger Stunden ein wenig Ammonsulfat zugab und hierbei die Lösung an einem kühlen Orte stehen ließ. Im Laufe eines Tages waren die Kristalle ausgefallen.

Nach dieser Methode gewonnene Kristalle sind in der Abb. 1 wiedergegeben, bei dem das Hämato-prosthetin<sup>1</sup> vom Rinde und das Globin vom Pferde stammt. Zu Vergleichszwecken zeigt die Abb. 2 Kristalle vom natürlichen Kohlenoxydhämoglobin vom Pferde, die mit Natriumoxalat erhalten und in den gleichen Formen kristallisiert waren wie das synthetische. (Die Abb. 2 entnahm ich dem Buche

<sup>1</sup> A. Herzog, diese Zeitschr. **264**, 412, 1933.

<sup>2</sup> A. Dénes, ebenda **223**, 481, 1930.

„The crystallographie of Hemoglobins“ von *E. T. Reichert* und *A. P. Brown*, Plates 26).

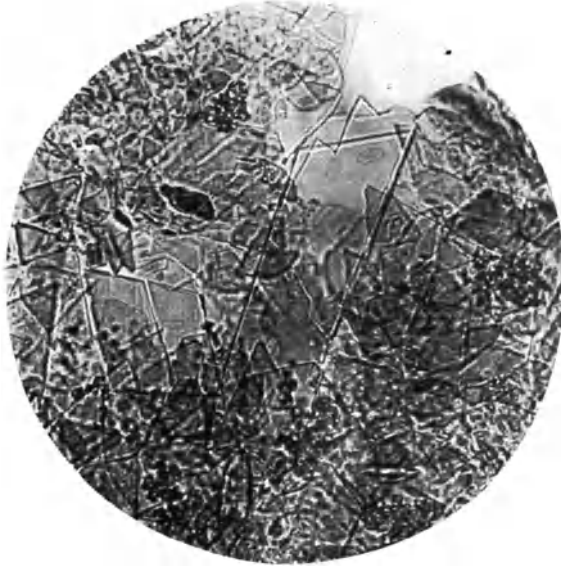


Abb. 1. Kristallisiertes synthetisches Kohlenoxydhämoglobin. Vergr. 600 fach.

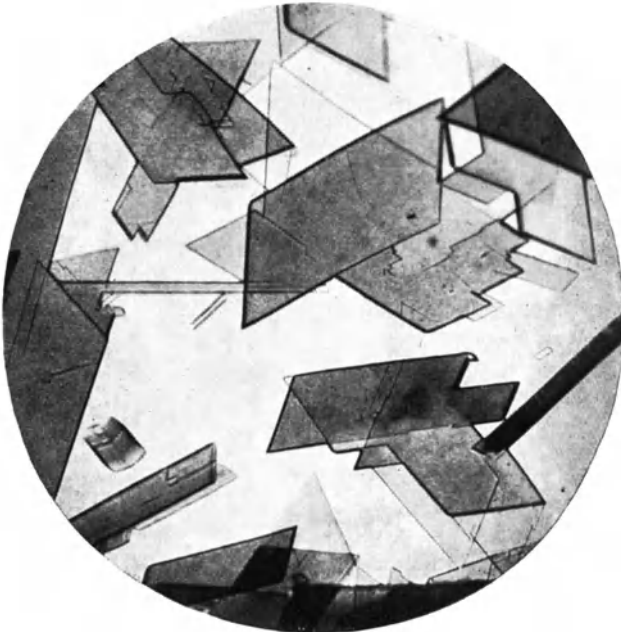


Abb. 2. Kristallisiertes natürliches Kohlenoxydhämoglobin.

Bei der Kristallisation mit Alkohol war die Lösung des synthetischen COHb ebenfalls durch zweimaliges Aussalzen und Wiederlösen in destilliertem Wasser von 34° C möglichst einkonzentriert und die filtrierte Lösung dann aber unter Belassung eines ziemlichen Überdruckes, um eine zu starke Verdünnung zu vermeiden, über Nacht gegen Leitungswasser und hierauf noch einige Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert worden. Nach Abkühlen auf 0° C wurde sehr vorsichtig, immer nur tropfenweise, unter ständigem Umrühren eisgekühlter Alkohol in einer Menge von höchstens einem Achtel zugegeben. Während des Stehens in einer Kältemischung waren dann nach 1 bis 2 Tagen die Kristalle ausgeschieden.

Nach dieser Methode habe ich ebenfalls wiederholt Kristalle von synthetischem COHb erhalten. Bei den Kristallen, die in Abb. 3



Abb. 3. Kristallisiertes synthetisches Kohlenoxydhämoglobin. Vergr. 400 fach.

dargestellt sind und durch Kristallisation mit Alkohol erhalten worden waren, *stammt das Hämatoprosthetin vom Menschen* (analysiertes Präparat 16<sup>1</sup>) *und das Globin vom Pferde.*

Wie aus diesen Versuchen hervorgeht, ist also *synthetisches Kohlenoxydhämoglobin kristallisationsfähig.*

<sup>1</sup> A. Herzog, l. c.

## Über eine neue Mikro-Glykogenbestimmungsmethode.

Von  
Stefan Simonovits.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ung. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 11. August 1933.)

Im Verlauf gewisser Experimente hatte sich die Notwendigkeit ergeben, besonders kleine Glykogenmengen zu bestimmen. Es schien mir zu diesem Zwecke die von *M. Sahyun*<sup>1</sup> jüngst angegebene Methode geeignet zu sein. Kontrollversuche aber, die später beschrieben werden sollen, hatten gezeigt, daß diese Methode mit mehr oder weniger großen Fehlern behaftet ist und daher durchaus unzuverlässige Resultate ergibt. Da meine Untersuchungen zur Aufdeckung des in der genannten Methode begründeten Fehlers führten und es mir gelang, auf Grund früher schon bekannter Bestimmungsprinzipien eine Mikromethode auszuarbeiten, soll auf meine diesbezüglichen Untersuchungen näher eingegangen sein.

### I. Kontrolle der Mikro-Glykogenbestimmungsmethode von Sahyun.

Das Prinzip der *Sahyunschen* Methode besteht darin, daß man kleine Mengen Glykogen enthaltenden Gewebes mit konzentrierter Kalilauge aufschließt und nach Zugabe von Tierkohle das Glykogen mit Alkohol fällt. Nach dem Zentrifugieren wird das am Boden des Zentrifugenrohres haftende und an Tierkohle adsorbierte Glykogen mit  $H_2SO_4$  hydrolysiert und die so erhaltene Zuckermenge mit einer Reduktionsmethode bestimmt.

#### a) Parallele Makro- und Mikrobestimmungen.

Um meine mit dieser Methode erhaltenen Versuchsergebnisse bewerten zu können, habe ich jeweils mit dem gleichen Versuchsmaterial Parallelversuche mit der von *Pflüger*<sup>2</sup> angegebenen Makromethode durchgeführt. Als Versuchsmaterial diente mir Muskelbrei, der frisch, noch im Schlachthofe — es sei hier Herrn Priv.-Doz. Dr. *G. Burghoffer* für sein Entgegenkommen bestens gedankt — verarbeitet wurde. Von der Benutzung der

<sup>1</sup> *M. Sahyun*, J. of biol. Chem. **93**, 227, 1931.

<sup>2</sup> *E. Pflüger*, Arch. f. d. ges. Physiol. **129**, 362, 1909.



von *Sahyun* zur Vermeidung der Glykogenolyse angegebenen flüssigen Luft konnte Abstand genommen werden, da die Versuche im Winter ausgeführt und die Versuchsproben binnen  $\frac{1}{2}$  Stunde nach dem Tode des Tieres abgewogen und mit siedender Kalilauge versetzt wurden. Das Material bei den Versuchsproben für die Makro- und Mikrobestimmungen wurde bei den Versuchen 1 bis 3 aus demselben Muskelbrei entnommen, und zwar wurden mit der Mikromethode zwei Parallelbestimmungen, bei der Makromethode hingegen nur eine Bestimmung ausgeführt. Bei den Versuchen 4 und 5 aber wurden jeweils zwei Proben von ein und demselben Muskelbrei mit Kalilauge aufgeschlossen, und jede der beiden Versuchsproben diente als Ausgangsmaterial für zwei Mikro- und eine Makrobestimmung, so daß bei diesen Versuchen von einem Muskelbrei vier Mikro- und zwei Makrobestimmungen vorliegen. Bei der Durchführung der Glykogenbestimmungen habe ich mich streng an die Vorschriften der von *Pflüger* und *Sahyun* angegebenen Methoden gehalten. Bei den Mikrobestimmungen wurde der Zuckergehalt nach der *Bangschen* Mikromethode, bei den Makrobestimmungen die Glykogenmenge durch Polarisierung bestimmt und ein Teil nach vorheriger Hydrolyse nach *Bang* titriert. Alle in den Tabellen angeführten Reduktionswerte sind aus drei Parallelbestimmungen berechnet. Bei der Polarisierung bediente ich mich eines *Lippichschen* Halbschattenapparates mit zweiteiligem Gesichtsfeld. Als Lichtquelle diente eine Natrium-Osramglühlampe.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Makrobestimmung nach <i>Pflüger</i>			Mikrobestimmung nach <i>Sahyun</i>		
	Unter- suchungs- material g	Glykogengehalt in % bestimmt durch		Unter- suchungs- material g	Glykogen- gehalt %	Verwendetes Kohlenpräparat
		Polarisation	Reduktion			
1	100,0	0,77	0,67	10,0	0,37	Carbo animalis pro analysi <i>Merck</i>
				10,0	0,16	
2	102,0	0,99	0,97	9,8	0,84	Carbo animalis zur Harnanalyse <i>Merck</i>
				11,0	0,85	
3	103,7	1,20	1,26	15,6	0,92	
				19,8	1,06	
4	62,8	0,55	0,53	3,49	0,41	Carbo animalis pro analysi <i>Merck</i>
				3,49	0,38	
	98,6	0,52	0,50	5,48	0,28	
				5,48	0,25	
5	116,8	0,99	0,98	4,17	0,79	Carbo medicinalis <i>Richter</i>
				4,17	0,76	
	124,3	0,97	0,94	4,44	0,72	
				4,44	0,69	

Aus der Tabelle I ist ersichtlich,  $\alpha$ ) daß die nach der *Sahyunschen* Methode erhaltenen Werte erheblich tiefer liegen als die Werte, welche die Makromethode liefert,  $\beta$ ) daß die Ergebnisse der Parallelversuche mit der Mikromethode größere Schwankungen zeigen als die mit der Makro-

bestimmung erhaltenen (Versuche 4 und 5). Auf Grund dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, daß bei der von *Sahyun* angegebenen Methode das Glykogen in nur unzuverlässigem Grade bestimmt wird.

b) Versuche mit Tierkohle.

Die Ursache der zu tiefen Glykogenwerte bei der *Sahyunschen* Methode darf in der Verwendung von Tierkohle erblickt werden, um so mehr als mit verschiedenen Kohlenpräparaten gearbeitet wurde und die mit der Mikromethode erhaltenen Werte in verschiedenem Grade von den Ergebnissen der Makrobestimmungen abweichen.

Aus der Literatur ist bezüglich der Wirkung von Tierkohle auf organische Substanzen bekannt, daß sie letztere teils adsorbiert, teils nach Adsorption oxydiert (Oxalsäure, Phenylthioharnstoff, Aminosäuren). Nach *Michaelis* und *Rona*<sup>1</sup> wird Glykose von Tierkohle adsorbiert. *Sahyun* konnte dagegen den Zucker aus einer Glykoselösung, die er mit Tierkohle geschüttelt und 5 Minuten in siedendem Wasserbad gehalten hatte, quantitativ zurück-erhalten. Um diese Widersprüche erklären zu können, habe ich folgende Versuchsreihen durchgeführt.

*Versuchsgruppe 1.* Ich versetzte 5 ccm einer Glykogenlösung, deren Konzentration durch Polarisieren bestimmt worden war, mit verschiedenen Mengen Tierkohle verschiedener Herkunft, hydrolysierte 2 Stunden hindurch in siedendem Wasserbad mit 5 ccm 2 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, neutralisierte nach Abkühlenlassen mit 2 n NaOH, übertrug in einen Meßkolben, füllte bis zur Marke auf und bestimmte den Zuckergehalt nach *Bang*. Die Glykogenmenge wurde durch Multiplikation des Zuckerwertes mit 0,927 ermittelt. Zur Kontrolle der so erhaltenen Glykogenwerte habe ich von jeder Glykogen-

Tabelle II.

Versuch Nr.	Verwendetes Kohlenpräparat	Glykogengehalt	
		der Ausgangslösung g	bestimmt nach Hydrolyse g
1	Ohne Kohlenbehandlung	0,0139	0,0134
	0,3 g Carbo medicinalis <i>Richter</i>	0,0139	0,0008
2	Ohne Kohlenbehandlung	0,0070	0,0066
	0,1 g Carbo animalis pro analysi <i>Merck</i>	0,0070	0,0011
3	Ohne Kohlenbehandlung	0,0155	0,0150
	0,05 g Carbo medicinalis <i>Richter</i>	0,0155	0,0051
	0,05 g " " <i>Merck</i>	0,0155	0,0048
	0,1 g " " <i>Richter</i>	0,0155	0,0032
	0,1 g " " <i>Merck</i>	0,0155	0,0035
	0,3 g " " <i>Richter</i>	0,0155	0,0019
4	Ohne Kohlenbehandlung	0,0226	0,0219
	0,05 g Carbo animalis pro analysi <i>Merck</i>	0,0226	0,0150
	0,1 g " " " " "	0,0226	0,0116
	0,2 g " " " " "	0,0226	0,0078

<sup>1</sup> *Michaelis* u. *Rona*, diese Zeitschr. 16, 489, 1909.

stammlösung einen Versuch ohne Verwendung von Tierkohle, sonst aber in der gleichen Weise ausgeführt. Die nach dem beschriebenen Verfahren erhaltenen Werte sind in Tabelle II zusammengestellt.

Wie die Kontrollversuche zeigen, kann man die Glykogenmenge nach Hydrolyse ohne Verlust zurückerhalten, wenn man von der Verwendung von Tierkohle absieht. Es ergeben sich aber um so größere Verluste, je mehr Tierkohle benutzt wurde.

*Versuchsgruppe 2.* Es sollte entschieden werden, ob es sich bei den eingetretenen Verlusten um eine Adsorption oder auch Oxydation von Zucker handelt. Zur Beantwortung dieser Frage stellte ich aus gewichtskonstanter „Glykose reinst“ (*Merck*) drei Lösungen bekannter Konzentration her, ließ diese wegen Multirotation 24 Stunden im Eisschrank stehen, teilte die Lösungen in drei Portionen, von denen die erste als Kontrollversuch diente, während die anderen beiden Portionen mit verschiedenen Mengen verschiedener Tierkohlenpräparate versetzt und öfters geschüttelt wurden. Jede dieser beiden Proben, desgleichen auch die Kontrollportion, wurde nach  $\frac{1}{2}$  Stunde und nach 24 Stunden abermals polarisiert. Die diesbezüglichen Versuchsergebnisse sind in der Tabelle III wiedergegeben.

Tabelle III.

Versuch Nr.	Verwendetes Kohlenpräparat	Glykosegehalt in %			Verlust %
		Ausgangs- lösung	polarisiert nach $\frac{1}{2}$ Std.	polarisiert nach 24 Std.	
1	Ohne Kohle	0,255	0,261	0,257	—
	0,5 % } Carbo animalis pro	0,255	0,213	0,214	17,1
	1,0 % } analysi <i>Merck</i>	0,255	0,171	0,163	35,3
2	Ohne Kohle	0,296	0,290	0,295	—
	0,5 % } Carbo medicinalis	0,296	0,255	0,260	12,6
	1,0 % } <i>Richter</i>	0,296	0,238	0,238	19,0
3	Ohne Kohle	0,130	0,127	0,128	—
	0,5 % } Carbo medicinalis	0,130	0,095	0,090	27,7
	1,0 % } <i>Merck</i>	0,130	0,066	0,066	48,4

Wie sich aus der Tabelle III ergibt, sinken in Übereinstimmung mit den vorherigen Versuchen die erhaltenen Zuckerwerte um so mehr, je mehr Tierkohle verwendet wurde. Desgleichen lassen diese Versuche auch, wie schon früher gefunden wurde, Unterschiede bei den verwendeten Kohlenpräparaten erkennen, die auf eine verschiedene Wirkungsaktivität der Präparate zurückgeführt werden können. Würde es sich aber bei den Glykogenverlusten um eine Oxydation des bei der Hydrolyse entstandenen Zuckers handeln, so wäre zu erwarten, daß die Zuckermenge während des 24stündigen Stehens mit Tierkohle (bei öfterem Umrühren) erheblich tiefere Werte zeigt als nach halbstündigem Stehen. Aus dem Gleichbleiben der Zuckerkonzentration während 24 Stunden aber muß eine Oxydation des Zuckers ausgeschlossen und mit *Michaelis* und *Rona* nur eine Adsorption angenommen werden.

*Versuchsgruppe 3.* Da aber noch die Möglichkeit bestand, daß zwar nicht Glykose, sondern Glykogen durch Tierkohle oxydiert wurde, ergänzte ich meine diesbezüglichen Versuche noch mit ähnlichen Versuchen, bei denen ich an Stelle von Glykose Glykogenlösungen benutzte. Die in dieser

Weise ausgeführten Versuche, die in Tabelle IV dargestellt sind, lassen in bezug auf Glykogen denselben Schluß zu, wie die vorherigen Versuche in bezug auf die Glykose.

Tabelle IV.

Versuch Nr.	Verwendetes Kohlenpräparat	Glykogengehalt in %			Verlust %
		Ausgangs- lösung	polarisiert nach 1/2 Std.	polarisiert nach 36 Std.	
1	Ohne Kohle	0,159	0,157	0,162	—
	0,5 % } Carbo animalis pro	0,159	0,144	0,150	7,8
	1,0 % } analysi Merck	0,159	0,136	0,139	13,5
2	Ohne Kohle	0,139	0,140	0,145	—
	0,5 % } Carbo animalis pro	0,139	0,122	0,123	14,2
	1,0 % } analysi Merck	0,139	0,108	0,110	23,5
3	Ohne Kohle	0,106	0,107	0,109	—
	0,5 % } Carbo medicinalis	0,106	0,103	0,104	3,9
	1,0 % } Merck	0,106	0,096	0,095	11,6

## II. Eine neue Mikro-glykogen-bestimmungs-methode.

Wie aus den vorherigen Versuchen hervorgeht, findet das Versagen der *Sahyun*schen Methode in der Verwendung von Tierkohle seine Aufklärung. Es gelang mir aber weiterhin in Anlehnung an das von *Pflüger* und *Sahyun* benutzte Prinzip eine Mikro-Glykogenbestimmungsmethode auszuarbeiten.

Je nach dem Glykogengehalt des betreffenden Organs werden 0,1 bis 4,0 g (oder mehr) frischen Gewebes in einem Zentrifugenrohr aus Jenaer Glas von etwa 15 cm Inhalt mit 60 %iger heißer Kalilauge auf das Dreifache versetzt. Die Röhren werden mit Zinnfolie bedeckt, 30 bis 40 Minuten in einem siedenden Wasserbad gehalten, bis die Lösung vollständig klar geworden ist. Um den Lösungsprozeß zu beschleunigen, empfiehlt es sich, das Zentrifugenrohr alle 5 oder 10 Minuten umzuschwenken. Nach dem Abkühlenlassen gibt man 0,5 ccm gesättigter NaCl-Lösung zu, versetzt mit der zweifachen Menge 96 %igen Alkohol, verrührt gründlich mit einem Glasstab und zentrifugiert, nach einstündigem Stehenlassen, 1/2 Stunde scharf ab. (Ich benutzte eine Zentrifuge mit 3500 Touren.) Nach Abgießen der Flüssigkeit wird das am Boden des Zentrifugenrohres haftende Glykogen in 3 ccm heißen Wassers gelöst, 0,5 ccm NaCl-Lösung zugesetzt, das Ausfällen mit der zweifachen Menge Alkohol wiederholt, umgerührt, 1 Stunde stehengelassen und nach scharfem Abzentrifugieren, wie vorher, die Flüssigkeit abgegossen. Nun wird das Glykogen in etwa 5 ccm heißen destillierten Wassers gelöst, unter Verwendung von Lackmuspapier mit einigen Tropfen 1 %iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> neutralisiert, in einen Meßkolben von 15 ccm überführt und bis zur Marke aufgefüllt. Die bei dem Neutralisieren ausgefallene Alkalialbuminate werden abfiltriert, und von dem Filtrat 13 ccm in einem Zentrifugenrohr mit 1,5 ccm gesättigter NaCl-Lösung und abermals mit dem zweifachen Volumen 96 %igen Alkohols versetzt. Nach gründlichem Umrühren und mindestens fünfständigem Stehenlassen

wird wieder  $\frac{1}{2}$  Stunde zentrifugiert, nach Abgießen der Flüssigkeit das am Boden des Zentrifugierrohres haftende Glykogen in 5 ccm heißen destillierten Wassers gelöst, 5 ccm 2 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugegeben und zwecks Hydrolyse 2 Stunden bedeckt mit Zinnfolie im siedenden Wasserbad gehalten. Nach Abkühlenlassen wird es mit 2 n NaOH neutralisiert, in einen Meßkolben übertragen und der Zucker mit einer Reduktionsmethode bestimmt. Da 0,0927 mg Glykogen 0,1 mg Glykose und dieser Wert bei der *Bangschen* Mikromethode, die ich verwendete, 0,28 ccm n/100  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  entspricht, so entfällt auf 0,1 ccm n/100  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,0331 mg Glykogen. Da die Bestimmungen in aliquoten Teilen gemacht wurden, wird der in dieser Weise ermittelte Glykogenwert mit 15/13 multipliziert.

In der Tabelle V sind mit dieser Methode ausgeführte Glykogenbestimmungen und die gleichzeitig durchgeführten Kontrollbestimmungen mit der Makromethode nach *Pflüger* angegeben. Bei diesen Versuchen wurden zwei abgewogene Proben des Versuchsmaterials (Muskelbrei) mit Kalilauge aufgeschlossen. Die so erhaltene Lösung — jeder der beiden Proben — diente als Ausgangsmaterial für eine Makro- und mehrere Mikroanalysen. Für die Mikrozuckerbestimmung nach *Bang* benutzte ich jene Menge der hydrolysierten Lösung, welche auf Grund der bei der Makromethode erhaltenen Werte in das Bestimmungsbereich der *Bangschen* Methode fällt.

Tabelle V.

Versuch Nr.	Makrobestimmung nach <i>Pflüger</i>		Eigene Mikrobestimmung		
	Untersuchungs- material g	Glykogengehalt in % bestimmt durch Polarisation	Untersuchungs- material g	Glykogengehalt	
				mg	%
6	87,6	1,27	3,68	42,7	1,16
			3,68	45,7	1,24
	91,9	1,24	3,50	43,6	1,25
			3,50	42,8	1,23
7	88,0	0,433	1,86	8,15	0,436
			1,86	8,17	0,438
			0,746	3,27	0,440
			0,746	2,91	0,390
	99,3	0,448	2,11	9,40	0,445
			2,11	8,81	0,418
			1,06	4,43	0,419
1,06	4,51	0,426			
8	92,6	0,435	0,271	1,21	0,448
			0,271	1,12	0,405
			0,135	0,581	0,426
			0,135	0,575	0,430
	135,4	0,443	—	—	—

Wie die Tabelle V zeigt, stimmen die bei der Makro- und Mikrobestimmung erhaltenen Werte gut überein.

*Zusammengefaßt* lauten die Ergebnisse obiger, auf Anregung und unter Leitung des weiland Prof. P. Hári ausgeführten Versuche wie folgt:

1. Bei Nachprüfung der *Sahyunschen* Methode wurden mit dieser bedeutend tiefere Glykogenwerte erhalten als bei der Makromethode *Pflügers*.

2. Als Ursache dieses Verlustes konnte die Adsorption durch Tierkohle festgestellt werden.

3. Es wurde eine Mikro-Glykogenbestimmungsmethode angegeben, mit der sich Glykogenmengen bis zu 0,6 mg bestimmen lassen.

*Sonderdruck*  
aus „*Biochemische Zeitschrift*“, Bd. 267.  
*Julius Springer, Berlin.*

# Über Methyl- und Äthylester des Hämatoprosthetins und einer Verbindung von der Formel $C_{34}H_{33}N_4O_4Fe$ und zur Frage der Kohlenstoffzahl der prosthetischen Gruppe des Blutfarbstoffes.

Von  
Alfred Herzog.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 7. Oktober 1933.)

Aus Gründen, die an späterer Stelle angeführt seien, stellte ich während meiner Studien über die prosthetische Gruppe des Blutfarbstoffes aus Hämatoprosthetin<sup>1</sup> und aus der ebenfalls von mir dargestellten kristallinen Verbindung von der Formel  $C_{31}H_{33}N_4O_4Fe$ , auf die ich früher schon hingewiesen hatte<sup>1</sup>, mit Methyl- und Äthylalkohol Ester dar. Es leiten sich also die Ester des Hämatoprosthetins von einer Verbindung mit 33, die der anderen Substanz von einer solchen mit 34 C-Atomen ab. Aus den Analysen der dargestellten Ester sollte dann die Zusammensetzung der den letzteren zugrundeliegenden Kernsubstanzen berechnet werden, denen dann die gleiche Kohlenstoffzahl zukommen muß, wie den Ausgangsprodukten.

## Darstellung der Präparate.

In Anlehnung an die Methode der Darstellung des  $\beta$ -Hämins, die schon W. Küster<sup>2</sup> zur Veresterung des Hämins und zur Darstellung von Methyl-estern aus Blut benutzt hatte, löste ich die betreffenden pulverisierten Substanzen in Methyl- bzw. Äthylalkohol, die mit verdünnter  $H_2SO_4$  angesäuert worden waren. Der filtrierten, auf dem Wasserbad siedenden Lösung setzte ich langsam einige Tropfen konzentrierter  $HCl$  zu, worauf nach einigen Minuten weiteren Siedens die Ester der verwendeten Substanzen kristallisiert ausfielen. Nach Absetzenlassen der Kristalle reinigte ich diese durch Waschen in der Zentrifuge zuerst mit einem Gemisch des verwendeten Alkohols und destillierten Wassers (zu gleichen Teilen), später nur mit destilliertem Wasser und trocknete die Präparate zuerst bei 38, nachher bei 100° C.

<sup>1</sup> A. Herzog, diese Zeitschr. 204, 412, 1933.

<sup>2</sup> W. Küster, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 82, 113, 1912.



## Beschreibung und Analysen des veresterten Hämatoprosthetins.

*Methylester:* Präparat 27 war in rechteckigen Platten von braunschwarzer Farbe kristallisiert und war löslich in Äthyl- und Methylalkohol, Aceton, Chloroform, Eisessig, Pyridin, Benzol (beim Erhitzen), schwach löslich in Äther, in Spuren löslich in konzentriertem, wässrigem Ammoniak und unlöslich in verdünnter NaOH und  $H_2SO_4$ . In 5%iger Sodalösung ging die Substanz bei Erhitzen in Lösung.

*Präparat 38 und 50* waren gleich, und zwar in braunen Nadeln kristallisiert und in gleicher Weise in Aceton, Chloroform, Eisessig, Pyridin und Benzol gut löslich, in Äthyl- und Methylalkohol schwächer, in Äther in Spuren löslich, und in konzentriertem, wässrigem Ammoniak, verdünntem NaOH und  $H_2SO_4$  unlöslich. In 5%iger Sodalösung lösten sich die Präparate auch beim Erhitzen nicht.

*Äthylester:* Präparat 57 war ebenfalls in kleinen braunen Nadeln kristallisiert, doch wichen diese in Form und Farbe von denen der Präparate 38 und 50 ab. In bezug auf Löslichkeit stimmte das Präparat mit den genannten Präparaten überein.

Die Analysen wurden von Herrn Dr. M. K. Zacherl am medizinisch-chemischen Institut der Universität Graz ausgeführt, wofür ihm an dieser Stelle bestens gedankt sei. Die Präparate wurden vor der Analyse bei  $100^\circ C$  im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Stickstoff wurde nach *Dumas-Pregl*, Methoxyl und Äthoxyl nach *Zeisel-Pregl* und Chlor nach *M. K. Zacherl* und *H. G. Krainick*<sup>1</sup> bestimmt.

*Präparat 27.* 5,474 mg Substanz lieferten bei  $p$  734,  $t$   $23^\circ C$ , 0,410 ccm  $N = 8,13\%$  N; 5,014 mg Substanz bei  $p$  734,  $t$   $22,5^\circ C$ , 0,374 ccm  $N = 8,31\%$  N; 5,290 mg Substanz 12,15 mg  $CO_2$ , 2,42 mg  $H_2O = 62,64\%$  C, 5,12% H; 5,475 mg Substanz 12,54 mg  $CO_2$ , 2,63 mg  $H_2O = 62,47\%$  C, 5,38% H; 3,220 mg Substanz 0,375 mg  $Fe_2O_3 = 8,13\%$  Fe; 4,315 mg Substanz 0,500 mg  $Fe_2O_3 = 8,10\%$  Fe; 5,844 mg Substanz 2,54 mg AgJ = 5,74%  $OCH_3$ ; 4,088 mg Substanz 1,80 mg AgJ = 5,82%  $OCH_3$ ; 7,463 mg Substanz verbrauchten 0,985 ccm n/100 NaOH = 4,68% Cl; 7,188 mg Substanz 0,955 ccm n/100 NaOH = 4,71% Cl.

*Präparat 38.* 4,581 mg Substanz lieferten bei  $p$  729,  $t$   $19^\circ C$ , 0,354 ccm  $N = 8,67\%$  N; 4,893 mg Substanz bei  $p$  724,  $t$   $23^\circ C$ , 0,390 ccm  $N = 8,76\%$  N; 3,253 mg Substanz 7,50 mg  $CO_2$ , 1,49 mg  $H_2O = 62,88\%$  C, 5,13% H; 4,357 mg Substanz 10,09 mg  $CO_2$ , 1,97 mg  $H_2O = 63,16\%$  C, 5,06% H; 3,263 mg Substanz 0,381 mg  $Fe_2O_3 = 8,17\%$  Fe; 4,537 mg Substanz 0,543 mg  $Fe_2O_3 = 8,37\%$  Fe; 3,753 mg Substanz 2,50 mg AgJ = 8,80%  $OCH_3$ ; 3,974 mg Substanz 2,54 mg AgJ = 8,44%  $OCH_3$ ; 6,392 mg Substanz verbrauchte 0,851 ccm n/100 NaOH = 4,72% Cl; 6,068 mg Substanz 0,773 ccm n/100 NaOH = 4,52% Cl.

*Präparat 50.* 3,699 mg Substanz lieferten bei  $p$  740,  $t$   $17^\circ C$ , 0,284 ccm  $N = 8,80\%$  N; 4,706 mg Substanz bei  $p$  740,  $t$   $17^\circ C$ , 0,371 ccm  $N = 9,04\%$  N; 3,265 mg Substanz 7,54 mg  $CO_2$ , 1,44 mg  $H_2O$ , 0,408 mg  $Fe_2O_3 = 62,98\%$  C, 4,94% H, 8,74% Fe; 3,716 mg Substanz 8,61 mg  $CO_2$ , 1,68 mg  $H_2O = 63,19\%$  C, 5,06% H; 3,076 mg Substanz 0,381 mg  $Fe_2O_3 = 8,66\%$  Fe; 3,254 mg Substanz 2,15 mg AgJ = 8,73%  $OCH_3$ ; 3,501 mg Substanz 2,29 mg AgJ = 8,64%  $OCH_3$ ; 5,766 mg Substanz verbrauchten 0,826 ccm n/100 NaOH = 5,08% Cl; 5,568 mg Substanz 0,826 ccm n/100 NaOH = 5,26% Cl.

<sup>1</sup> M. K. Zacherl u. H. G. Krainick, Mikrochem. 11, 61, 1932.

*Präparat 57.* 4,665 mg Substanz lieferten bei  $p$  735,  $t$  17° C, 0,304 ccm N = 7,42 % N; 4,376 mg Substanz bei  $p$  735,  $t$  22° C, 0,295 ccm N = 7,54 % N; 3,853 mg Substanz 8,98 mg CO<sub>2</sub>, 1,89 mg H<sub>2</sub>O, 0,440 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 63,96 % C, 5,52 % H, 8,03 % Fe; 4,011 mg Substanz 9,40 mg CO<sub>2</sub>, 2,01 mg H<sub>2</sub>O = 63,77 % C, 5,36 % H; 4,369 mg Substanz 0,507 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 8,12 % Fe; 4,402 mg Substanz 3,25 mg AgJ = 13,61 % OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; 3,183 mg Substanz 2,23 mg AgJ = 13,44 % OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; 6,459 mg Substanz verbrauchten 1,006 ccm n/100 NaOH = 5,52 % Cl; 5,649 mg Substanz 0,906 ccm n/100 NaOH = 5,69 % Cl.

## Mittelwerte.

	Präparat 27	Präparat 38	Präparat 50	Präparat 57	Berechnet für		
					C <sub>34</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> FeCl	C <sub>35</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> FeCl	C <sub>37</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> FeCl
					%	%	%
C . .	62,55	63,02	63,09	63,87	62,59	63,10	64,01
H . .	5,25	5,10	5,00	5,44	4,95	5,15	5,52
N . .	8,32	8,71	8,92	7,48	8,64	8,42	8,08
Fe . .	8,12	8,27	8,70	8,08	8,57	8,39	8,05
Cl . .	4,70	4,62	5,17	5,60	5,44	5,33	5,11
OCH <sub>3</sub>	5,78	8,62	8,69	—	4,76	9,03	—
OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	—	—	—	13,52	—	—	12,99

Auf Grund der Analysen entspricht also Präparat 27 einem *Mono-methylester*, Präparat 38 und 50 einem *Dimethylester* und Präparat 57 einem *Diäthylester des hypothetischen Chlorhämato-prosthetins*. Mit dem Vorliegen eines Monomethylesters im Präparat 27 stimmt nach *W. Küster* auch dessen Löslichkeit in 5%iger heißer Sodalösung, mit dem Vorliegen von Dimethylestern in den Präparaten 38 und 50 deren Unlöslichkeit in 5%iger heißer Sodalösung überein<sup>1</sup>.

Beschreibung und Analysen der veresterten Substanz C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Fe.

*Methylester:* Die Präparate 23 und 37 waren gleich, und zwar in dunkelbraunen feinen Nadeln kristallisiert, die sich oft zu Doppelkeulenformen zusammenlagerten, und waren in gleicher Weise löslich in Aceton, Chloroform, Eisessig, Pyridin und Benzol, schwach löslich in Methyl- und Äthylalkohol, in Spuren löslich in Äther, und unlöslich in Ammoniak, verdünntem NaOH und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, desgleichen in 5%iger Sodalösung, auch nicht beim Erhitzen.

*Äthylester:* Präparat 54 und 55 waren ebenfalls gleich kristallisiert, und zwar in feinen Nadeln, die von denen der Präparate 23 und 37 in Form und Farbe verschieden waren, hingegen gegenüber letzteren in bezug auf Löslichkeit lediglich insofern einen Unterschied zeigten, als sie in 5%iger Sodalösung beim Erhitzen teilweise in Lösung gingen.

In den Kristallformen waren diese Präparate von den entsprechenden des Hämato-prosthetins abweichend.

Bezüglich der Durchführung der Analysen gilt das bei den Analysen des veresterten Hämato-prosthetins Gesagte.

<sup>1</sup> *W. Küster*, I. c.

*Präparat 23.* 4,382 mg Substanz lieferten bei  $p$  732,  $t$  20° C, 0,325 ccm N = 8,34 % N; 4,058 mg Substanz bei  $p$  732,  $t$  22° C, 0,309 ccm N = 8,48 % N; 4,372 mg Substanz 10,13 mg CO<sub>2</sub>, 2,27 mg H<sub>2</sub>O = 63,19 % C, 5,81 % H; 5,255 mg Substanz 12,20 mg CO<sub>2</sub>, 2,75 mg H<sub>2</sub>O = 63,32 % C, 5,85 % H; 4,014 mg Substanz 0,496 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 8,64 % Fe; 5,685 mg Substanz 0,685 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 8,43 % Fe; 4,327 mg Substanz 2,65 mg AgJ = 8,09 % OCH<sub>3</sub>; 4,385 mg Substanz 2,54 mg AgJ = 7,83 % OCH<sub>3</sub>; 5,791 mg Substanz verbrauchten 0,724 ccm n/100 NaOH = 4,43 % Cl; 5,709 mg Substanz 0,694 ccm n/100 NaOH = 4,31 % Cl.

*Präparat 37.* 4,668 mg Substanz lieferten bei  $p$  728,  $t$  21° C, 0,375 ccm N = 8,90 % N; 4,697 mg Substanz bei  $p$  729,  $t$  23° C, 0,384 ccm N = 9,04 % N; 4,149 mg Substanz 9,63 mg CO<sub>2</sub>, 1,98 mg H<sub>2</sub>O = 63,30 % C, 5,43 % H; 3,955 mg Substanz 9,16 mg CO<sub>2</sub>, 1,89 mg H<sub>2</sub>O = 63,17 % C, 5,35 % H; 4,754 mg Substanz 0,578 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 8,50 % Fe; 2,554 mg Substanz 0,315 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 8,63 % Fe; 3,912 mg Substanz 2,40 mg AgJ = 8,10 % OCH<sub>3</sub>; 3,813 mg Substanz 2,29 mg AgJ = 7,93 % OCH<sub>3</sub>; 6,172 mg Substanz verbrauchten 0,931 ccm n/100 NaOH = 5,35 % Cl; 5,703 mg Substanz 0,840 ccm n/100 NaOH = 5,22 % Cl.

*Präparat 54.* 3,270 mg Substanz lieferten bei  $p$  735,  $t$  17° C, 0,250 ccm N = 8,70 % N; 3,127 mg Substanz bei  $p$  735,  $t$  17° C, 0,246 ccm N = 8,96 % N; 4,483 mg Substanz 10,48 mg CO<sub>2</sub>, 2,17 mg H<sub>2</sub>O = 63,76 % C, 5,42 % H; 3,419 mg Substanz 8,00 mg CO<sub>2</sub>, 1,65 mg H<sub>2</sub>O = 63,81 % C, 5,40 % H; 5,256 mg Substanz 0,607 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 8,08 % Fe; 3,367 mg Substanz 0,389 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 8,08 % Fe; 3,670 mg Substanz 1,85 mg AgJ = 9,67 % OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; 3,799 mg Substanz 1,89 mg AgJ = 9,45 % OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; 5,814 mg Substanz 0,796 ccm n/100 NaOH = 4,85 % Cl; 5,972 mg Substanz 0,826 ccm n/100 NaOH = 4,90 % Cl.

*Präparat 55.* 3,969 mg Substanz lieferten bei  $p$  734,  $t$  18° C, 0,297 ccm N = 8,48 % N; 3,969 mg Substanz bei  $p$  735,  $t$  18° C, 0,299 ccm N = 8,55 % N; 3,688 mg Substanz 8,60 mg CO<sub>2</sub>, 1,72 mg H<sub>2</sub>O = 63,60 % C, 5,22 % H; 4,131 mg Substanz 9,66 mg CO<sub>2</sub>, 1,89 mg H<sub>2</sub>O, 0,492 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 63,77 % C, 5,36 % H, 8,20 % Fe; 4,275 mg Substanz 0,501 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 8,20 % Fe; 3,351 mg Substanz 1,69 mg AgJ = 8,85 % OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; 3,317 mg Substanz 1,66 mg AgJ = 8,74 % OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; 5,331 mg Substanz verbrauchten 0,926 ccm n/100 NaOH = 6,16 % Cl; 6,051 mg Substanz 1,025 ccm n/100 NaOH = 6,02 % Cl.

Mittelwerte.

	Präparat 23	Präparat 37	Präparat 54	Präparat 55	Berechnet für		
					C <sub>36</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> FeCl	C <sub>36</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> FeCl	C <sub>38</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> FeCl
					%	%	%
C	63,25	63,24	63,79	63,69	63,55	63,55	64,44
H	5,83	5,39	5,41	5,29	5,34	5,34	5,70
N	8,41	8,97	8,83	8,52	8,24	8,24	7,91
Fe	8,53	8,57	8,08	8,27	8,22	8,22	7,89
Cl	4,37	5,29	4,88	6,09	5,22	5,22	5,01
OCH <sub>3</sub>	7,96	8,02	—	—	9,13	—	—
OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	—	—	9,56	8,80	—	6,63	12,73

Aus der Tabelle ergibt sich, daß die Präparate 23 und 37 als *Dimethylester* betrachtet werden können und daß es sich bei den Prä-

paraten 54 und 55 anscheinend um *Mischpräparate des Mono- und Diäthylesters* handelt, wie aus einem Vergleich der gefundenen mit den verlangten Äthoxylwerten hervorgeht. Mit dieser Annahme im Einklang stehend dürfte auch die teilweise Löslichkeit der beiden Präparate beim Erhitzen mit 5%iger Sodalösung aufzufassen sein. Da nun aber weiterhin die Ausgangssubstanz durch Erhitzen mit NaCl und Eisessig in *Teichmannsche* Kristalle überführbar ist und ein Dimethylhämin *W. Küsters*<sup>1</sup> dieselbe Zusammensetzung (nämlich 63,31 % C, 5,3 % H, 8,55 % Fe, 5,8 % Cl und 8,32 % OCH<sub>3</sub>) zeigte, können die *dargestellten Ester als mit den entsprechenden des Schälfejewischen Hämins identisch* aufgefaßt werden.

#### Besprechung der Versuchsergebnisse.

Schon die Zusammensetzung des Präparats 27 mit 62,55 % C und 5,78 % OCH<sub>3</sub>, dessen C-Wert also dem eines *Schälfejewischen Hämins* entspricht, weist darauf hin, daß die Kernsubstanz dieses Präparats 33 Kohlenstoffatome besitzen muß. Ich habe daher bei allen angeführten Präparaten aus den gefundenen Analysenwerten die Zusammensetzung ihrer Kernsubstanzen wie folgt berechnet.

Ich subtrahierte den aus dem gefundenen Methoxyl- bzw. Äthoxylwert errechneten Kohlenstoffwert (Wert *A*) von dem gefundenen C-Wert des Präparates, und weiterhin jenen Wert, der von dem gefundenen Methoxyl- bzw. Äthoxylwert einer CH<sub>2</sub>- bzw. C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Gruppe entspricht (ein Wasserstoff muß wegen des Wasserstoffs der Carboxylgruppe in Rechnung gestellt werden) (Wert *B*), von 100 und rechnete das Verhältnis dieser beiden Werte auf 100 um. In ähnlicher Weise ging ich bei der Berechnung des prozentualen Wasserstoffs der Kernsubstanz vor, während N, Fe und Cl direkt mit Wert *B* ins Verhältnis gesetzt und auf 100 bezogen wurden. Am Präparat 27 gestaltet sich z. B. die Berechnung folgendermaßen. Gefundene Zusammensetzung des Präparates: 62,55 % C, 5,25 % H, 8,83 % N, 8,12 % Fe, 4,70 % Cl und 5,78 % OCH<sub>3</sub>.

#### Kohlenstoff.

Wert *A* erhält man nach der Gleichung  $5,78 : x = 31,024 : 12$  und beträgt 2,23; Wert *B* erhält man nach der Gleichung  $5,78 : x = 31,024 : 14,016$  und beträgt 2,61; Wert *A* wird von 62,55 subtrahiert und ergibt 60,32, Wert *B* von 100 und ergibt 97,39. Nach der Gleichung  $60,32 : 97,39 = x : 100$  erhält man als prozentualen Kohlenstoff der Kernsubstanz 61,94 % C.

#### Wasserstoff.

Nach der Gleichung  $5,78 : x = 31,024 : 1,008$  erhält man als Wert *A* 0,184, der mit zwei multipliziert (weil es sich hier um zwei Wasserstoffe handelt) und von 5,25 abgezogen wird. Aus dem so erhaltenen Wert 4,88 wird nach der Gleichung  $4,88 : 97,39 = x : 100$  der prozentuale Wasserstoff der Kernsubstanz berechnet und beträgt 5,01 % H.

<sup>1</sup> *W. Küster*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 82, 151, 1912.

*Stickstoff, Eisen und Chlor.*

Die prozentualen Werte der Kernsubstanz dieser Elemente werden nach der Gleichung *gefundenener Wert*:  $97,39 = x : 100$  berechnet. Für die einzelnen Elemente ergeben sich daher folgende Werte:

$$\frac{8,33 \cdot 100}{97,39} = 8,55\% \text{ N}; \quad \frac{8,12 \cdot 100}{97,39} = 8,34\% \text{ Fe}; \quad \frac{4,70 \cdot 100}{97,39} = 4,82\% \text{ Cl.}$$

Berechnete Zusammensetzung der Kernsubstanz des veresterten Hämatoprosthetins.

	Präparat 27 %	Präparat 38 %	Präparat 50 %	Präparat 57 %	Mittelwert %	Berechnet für $C_{33}H_{30}N_4O_4FeCl$ %
C . . .	61,94	62,11	62,17	61,75	61,99	62,14
H . . .	5,00	4,72	4,62	4,44	4,69	4,74
N . . .	8,55	9,06	9,28	8,15	8,76	8,79
Fe . . .	8,34	8,60	9,06	8,80	8,70	8,76
Cl . . .	4,82	4,81	5,38	6,10	5,27	5,57

Berechnete Zusammensetzung der Kernsubstanz der veresterten Verbindung  $C_{34}H_{33}N_4O_4Fe$ .

	Präparat 23 %	Präparat 37 %	Präparat 54 %	Präparat 55 %	Mittelwert %	Berechnet für $C_{34}H_{32}N_4O_4FeCl$ %
C . . .	62,42	62,40	62,41	62,43	62,41	62,59
H . . .	5,40	5,05	4,84	4,39	4,92	4,95
N . . .	8,72	9,31	9,39	9,01	9,11	8,64
Fe . . .	8,84	8,89	8,59	8,75	8,78	8,57
Cl . . .	4,53	5,49	5,19	6,44	5,41	5,44

Eine ähnliche Zusammensetzung ergibt auch die Kernsubstanz des früher angeführten Dimethylhämipräparates *W. Küsters*, nämlich 62,51 % C, 4,83 % H, 8,88 % Fe und 6,03 % Cl, die also mit der Zusammensetzung der Ausgangssubstanz, einem nach *Schalfejew* dargestellten Hämin, übereinstimmt. Bei einem veresterten Hämatin *W. Küsters*, das 65 % C und 2,1 %  $CH_3$  bei den Analysen ergeben hatte<sup>1</sup>, führt die Berechnung des Kohlenstoffes der Kernsubstanz zu einem Wert von 64,49 %, der mit dem für ein Hämatin verlangten C-Wert von 64,44 % ebenfalls sehr gut übereinstimmt.

Aus den beiden Tabellen und Präparaten *W. Küsters* geht hervor, daß die Berechnung tatsächlich zu Werten führt, die sich für die Kernsubstanz der veresterten Verbindungen erwarten lassen. Es entsprechen also die für die Kernsubstanz des veresterten Hämatoprosthetins errechneten Werte einem hypothetischen *Chlorhämatoprosthetin*, die für die Kernsubstanz der veresterten Verbindung von der Formel  $C_{34}H_{33}N_4O_4Fe$  errechneten Werte der Zusammensetzung eines *Schalfejew*-

<sup>1</sup> *W. Küster*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 86, 185, 1913.

sehen Hämins. Wenn auch die Differenz im Kohlenstoff der Kernsubstanzen zwischen den Präparaten 27, 38, 50, 57 einerseits und den Präparaten 23, 37, 54, 55 andererseits nicht groß ist, so entspricht sie vollständig der Erwartung und ist konstant vorhanden. Ich muß daher in dieser konstanten Differenz im Kohlenstoff und der Übereinstimmung mit der erwarteten berechneten Zusammensetzung einen weiteren Beweis dafür erblicken, daß das Hämatoprosthetin nur 33 Kohlenstoffe besitzt, wobei hervorgehoben sei, daß es sich bei sämtlichen Präparaten um chlorierte, veresterte Substanzen handelt und sich die Verbindung von der Formel  $C_{34}H_{33}N_4O_4Fe$  vom Hämatoprosthetin lediglich durch den Mehrbesitz eines C- und zweier H-Atome unterscheidet.

Zur Frage der Zahl der C-Atome der prosthetischen Gruppe des Blutfarbstoffs.

Die Darstellung und Berechnung der Kernsubstanzen der vorherbeschriebenen Präparate habe ich vornehmlich deswegen vorgenommen, um eine Bewertungsgrundlage für Präparate von Methylestern der prosthetischen Gruppe des Blutfarbstoffes zu erlangen, die W. Küster nach der Methode der Darstellung des  $\beta$ -Hämins, jedoch mit Methylalkohol statt Äthylalkohol, gewonnen hatte. Auf Grund der immer nur teilweisen Löslichkeit der Rohprodukte in bestimmten Lösungsmitteln hatte W. Küster erkannt, daß es sich bei seinen Rohprodukten um Mischprodukte handle; er hatte daher versucht, diese Rohprodukte teils durch fraktionierte Umkristallisation, teils durch Lösen und weitere Veresterung aufzuschließen und reine Präparate zu gewinnen<sup>1</sup>.

Nun habe ich die C-Werte der Kernsubstanzen dieser unkristallisierten bzw. ungeschiedenen Präparate berechnet und diese neben den von W. Küster gefundenen C- und  $CH_3$ -Werten und der Seitenzahl der Bände, wo ich die Analysenergebnisse gefunden habe, in der folgenden Tabelle angeben.

Tabelle.

Seite	Gefundener C-Wert	Gefundener $CH_3$ -Wert	Errechneter C-Wert der Kernsubstanz	Seite	Gefundener C-Wert	Gefundener $CH_3$ -Wert	Errechneter C-Wert der Kernsubstanz
	%	%	%		%	%	%
128	63,49	4,19	62,58	138	62,94	1,70	62,65
130	63,60	3,90	62,77	139	63,00	3,20	62,30
130	63,60	2,60	63,05	140	63,12	2,92	62,49
131	62,40	2,18	61,92	142	62,97	3,17	62,28
131	62,42	2,25	61,92	143	63,25	1,90	62,84
132	63,14	4,15	62,24	143	63,08	1,80	62,65
132	63,30	4,09	62,42	143	62,78	1,83	62,38
134	64,17	3,50	63,45	149	63,04	3,65	62,25
134	63,93	3,80	63,13	194	63,23	4,60	62,23
134	62,98	3,10	62,30	194	63,39	4,44	62,42
135	63,51	2,21	63,05	196	63,06	4,40	62,10
138	63,47	3,08	62,95				

<sup>1</sup> W. Küster, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 82, 128—149, 1912; 86, 194, 196, 1913.

Die Tabelle zeigt, daß den in Frage stehenden Präparaten *W. Küsters* Kernsubstanzen zugrunde liegen, die *einen ganz verschiedenen C-Gehalt* aufweisen, der *teils viel tiefer, teils aber auch viel höher liegt, als er beim Schälfejew-Hämin gefunden wird*, so daß sich schon aus diesem verschiedenen C-Gehalt der Kernsubstanzen die von *W. Küster* bei seinen Rohprodukten gefundene immer nur teilweise Löslichkeit in bestimmten Lösungsmitteln erklärt. Wenn man die für die Kernsubstanzen dieser Präparate berechneten C-Werte mit den C-Werten des Chlorhämato­pro­sthe­tins des nach *Schälfejew* dargestellten Hämins und einer hypothetischen Verbindung vergleicht, die noch ein Kohlenstoffatom und zwei Wasserstoffe mehr besitzt als letzteres, so ergibt sich, da den genannten Verbindungen 62,14, 62,59 und 63,10 % C zukommen, daß die C-Werte der Kernsubstanzen der Präparate *W. Küsters* teils dem eines Chlorhämato­pro­sthe­tins, teils dem eines Schälfejew-schen Hämins, teils aber auch dem einer Verbindung von der Formel  $C_{35}H_{34}N_4O_4FeCl$  nahe stehen. Wenn man weiterhin für Schälfejew-sches Hämin eine Schwankungsbreite der C-Werte zwischen 62,33 und 62,80 % C annimmt (von 20 Analysen der Literatur fand ich nur drei, bei denen der C-Wert unter 62,33 % lag), so würden von diesen Präparaten *W. Küsters* acht mit einer Kernsubstanz von 34, neun (weniger als 62,33 % C enthaltende Kernsubstanzen) mit einer solchen von 33 und sechs (mehr als 62,80 % C enthaltende Kernsubstanzen) mit einer solchen von 35 Kohlenstoffatomen aufzufassen sein. (Vereinzelte Präparate *Küsters*, die auf eine Kernsubstanz mit noch höherer Kohlenstoffzahl lauten, habe ich nicht angeführt.) Die acht Präparate mit Kernsubstanzen von 34 C-Atomen ergeben einen C-Mittelwert von 62,54 % (nach Schälfejew dargestelltes Hämin verlangt 62,59 % C), die neun Präparate mit Kernsubstanzen von 33 C-Atomen ergeben als Mittelwert 62,17 % C (Chlorhämato­pro­sthe­tin verlangt 62,14 % C) und die sechs Präparate mit Kernsubstanzen von 35 C-Atomen ergeben einen Mittelwert von 63,08 % C (für  $C_{35}H_{34}N_4O_4FeCl$  berechnet 63,10 % C).

Aus der Übereinstimmung der angeführten Mittelwerte mit den von den genannten Vergleichssubstanzen verlangten Werten muß ich in Anlehnung an meine eingangs beschriebenen Experimente schließen, daß den in Frage stehenden Methylestern *W. Küsters* Kernsubstanzen mit 33, 34 und 35 C-Atomen zukommen. Besäße die prosthetische Gruppe des Hämoglobins aber 34 C-Atome, dann wären C-Werte von Kernsubstanzen bei umkristallisierten bzw. umgeschiedenen Präparaten von 61,92, 61,92 und 62,10 % C nicht zu verstehen. Da sich aber weiterhin eine Annahme, daß es sich bei der prosthetischen Gruppe nicht um eine, sondern um mehrere Substanzen mit 33, 34 und mehr C-Atomen handelt, mit verschiedenen experimentellen Tatsachen nicht vereinbaren läßt, da ferner bei meinen veresterten Präparaten und zwei entsprechenden Präparaten *W. Küsters* die für die Kernsubstanz errechnete prozentuale C-Zahl mit der erwarteten übereinstimmte, daher der verwendete *Methylalkohol* für den höheren C-Gehalt verschiedener in der Tabelle angegebener *Küsterscher* Präparate nicht gut verantwortlich gemacht werden kann, so muß ich in den in der Tabelle angeführten Präparaten *W. Küsters* Produkte erblicken, bei denen die Spaltung der prosthetischen Gruppe vom Globin in ungleicher Weise verlaufen ist, und zwar so, daß

bei der Spaltung des Hämoglobins ein bis mehrere ursprünglich dem Globin zugehörnde Kohlenstoffe an die prosthetische Gruppe gebunden geblieben sind. Zur gleichen Annahme aber sah ich mich schon anlässlich der Darstellung Teichmannscher Kristalle aus dem mit Hämatoprosthetin synthetisierten Hämoglobin veranlaßt<sup>1</sup>. Daß aber die Zahl 33 für die C-Atome die tiefste ist, die sich aus den Küsterschen Präparaten für die Kernsubstanzen ergibt, weist darauf hin, daß die prosthetische Gruppe des Blutfarbstoffs 33 Kohlenstoffatome besitzt.

#### Zusammenfassung.

1. Es konnten Methyl- und Äthylester des Hämatoprosthetins und einer Verbindung von der Formel  $C_{34}H_{33}N_4O_4Fe$  dargestellt und beschrieben werden.

2. Durch Berechnung konnte die Zusammensetzung der Kernsubstanzen der veresterten Präparate ermittelt und so abermals nachgewiesen werden, daß das Hämatoprosthetin nur 33 C-Atome besitzt.

3. Es konnte durch Berechnung gezeigt werden, daß den von W. Küster aus Blut dargestellten Methylestern Kernsubstanzen mit einer Zahl von C-Atomen von 33 aufwärts zugrunde liegen und weiterhin in Übereinstimmung mit früheren Versuchsergebnissen die Auffassung vertreten werden, daß

a) die veresterten Präparate mit Kernsubstanzen von 33 C-Atomen als Ester der prosthetischen Gruppe des Blutfarbstoffs anzusehen,

b) die Kernsubstanzen mit mehr als 33 Kohlenstoffatomen aber auf eine nicht immer an den gleichen Stellen erfolgende Spaltung vom Globin zurückzuführen sind, so daß ursprünglich dem Globin zugehörnde C-Atome an die prosthetische Gruppe gebunden bleiben.

---

<sup>1</sup> A. Herzog, l. c.



## Über die Lichtbrechung der Hämoglobine verschiedener Tierarten.

Von  
Stefan Schönberger.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 7. Oktober 1933.)

Es liegen bereits von manchen Autoren Befunde darüber vor, daß die Hämoglobine verschiedener Tierarten in ihren chemischen und optischen Eigenschaften Unterschiede zeigen. So fanden z. B. *Valer*<sup>1</sup>, *Kaiser*<sup>2</sup>, *Timár*<sup>3</sup> Verschiedenheiten im Schwefelgehalt, *Macela* und *Seliskar*<sup>4</sup> in der Sauerstoffdissoziationskurve, *Simonovits*<sup>5</sup> in der optischen Aktivität der Oxyhämoglobine, *Barcroft* und Mitarbeiter<sup>6</sup> schließlich in der Lage der Absorptionsbande im Spektrum der CO-Hämoglobine verschiedener Tierarten. Es war daher die Frage von Interesse, ob diese Verschiedenheiten auch in den Refraktionskonstanten zum Ausdruck kommen, die ja in hohem Maße von der Konstitution der Molekel abhängig ist.

Es finden sich zwar in der Literatur Angaben über refraktometrische Untersuchungen im Blute. So teilen *Stoddard* und *Adair*<sup>7</sup> mit, daß sie die Konstante „*a*“<sup>8</sup> des Hämoglobins aus Menschenblut gleich 194 gefunden haben. *Howard*<sup>9</sup> hingegen, der mit der Möglichkeit, daß die Konstanten „*a*“

<sup>1</sup> Diese Zeitschr. 190, 444, 1927.

<sup>2</sup> Ebenda 192, 58, 1928.

<sup>3</sup> Ebenda 202, 365, 1928.

<sup>4</sup> J. of Physiol. 60, 428, 1925.

<sup>5</sup> Diese Zeitschr. 233, 449, 1931.

<sup>6</sup> Proc. Roy. Soc. B. 97, 61, 1925.

<sup>7</sup> J. of biol. Chem. 57, 437, 1923.

<sup>8</sup> Bezeichnet  $n_1$  den Brechungsexponenten des Lösungsmittels,  $n_2$  den Brechungsexponenten der Lösung,  $c$  die Konzentration des gelösten Proteins, so ist  $\frac{n_2 - n_1}{c} = a$ . „*a*“ bezeichnet also das Refraktionsinkrement, das irgendein Lösungsmittel durch Auflösen 1% irgendeiner Substanz erfährt. In vorliegender Arbeit wird stets  $a \cdot 10^5$  gebraucht.

<sup>9</sup> J. of biol. Chem. 41, 537, 1920.

für das Hämoglobin aus Blutlösungen verschiedener Tierarten verschieden sein können, gar nicht rechnet, teilt einen aus *Kaninchen-, Ratten-, Hunde-, Pferde- und Rinderblut* ermittelten Mittelwert für die Konstante „*a*“ gleich 178 mit, ohne jedoch die einzelnen gefundenen Konstanten in seiner Arbeit anzugeben. Aus seinen Angaben können sie jedoch berechnet werden.

Tabelle I.

Tierart	$10^5 \cdot a$	Tierart	$10^5 \cdot a$
Kaninchen	175	Hund	194
„	173	Pferd	188
Ratte	160	„	178
„	179	Rind	175
Hund	174	„	188
„	163	„	170
„	178	„	181
„	176	„	176

Aus den so berechneten Werten, die in Tabelle I zusammengestellt sind, ist ersichtlich, daß *Differenzen in den Konstanten bei ein und derselben Tierart bis etwa 17% bestehen, und daher die Berechnung eines Mittelwertes gar nicht berechtigt ist.*

Aus der Literatur ist also nicht zu entscheiden, ob Hämoglobine verschiedener Herkunft auch verschiedene refraktometrische Konstanten haben; die Entscheidung der Frage jedoch ist nicht nur theoretisch, sondern auch praktisch wichtig, da ja sowohl *Howard* wie *Stoddard* und *Adair* die Refraktionskonstante „*a*“ zwecks *Konzentrationsbestimmungen* festgestellt haben; wenn nämlich die Refraktionskonstante des Hämoglobins je nach der Tierart verschieden ist, so muß man dies bei den Konzentrationsbestimmungen an Blut- bzw. Hämoglobinlösungen verschiedener Tierarten berücksichtigen, und man kann sich mit einem „Mittelwert“, wie dies *Howard* tut, nicht begnügen. Es soll demnach im folgenden über Untersuchungen berichtet werden, die *auf Anregung und unter Leitung von weil. Prof. P. Hári* ausgeführt wurden, und die sich außer mit der Beantwortung der oben gestellten Frage auch mit jener beschäftigen, welche *den Einfluß des Lösungsmittels, fernerhin des wiederholten Umkristallisierens auf die Refraktionskonstante „a“ betrifft.*

#### Die Methodik der Versuche.

Als Ausgangsmaterial diente kristallisiertes Oxyhämoglobin aus Pferde-, Rinder- und Hundeblood. Das Oxyhämoglobin vom Pferd wurde nach *Willstätter* und *Pollinger*, das vom Hunde nach *Hoppe-Seyler* dargestellt. Um eine bessere Abscheidung der Stromata zu erreichen, mußte ich bei der Gewinnung des Oxyhämoglobins aus Rinderblut von der *Willstätter-Pollingerschen* Methode abweichend vorgehen, und — worauf

schon *Simonovits* (l. c.) aufmerksam machte — dem Ätherhämolytat vor dem Zentrifugieren  $\frac{1}{10}$  bis  $\frac{1}{5}$  Volumen destillierten Wassers zusetzen. Aus dem Kristallkuchen wurden etwa 1,0- bis 5,0%ige Lösungen bereitet, anfangs sowohl in Wasser als auch in 0,1%iger Natriumhydrocarbonatlösung und 0,1%iger Ammoniaklösung, später aber nur in 0,1%iger Ammoniaklösung. Die Konzentration der Lösungen wurde aus dem Gehalt an Trockensubstanz berechnet. Zu diesem Zwecke wurden zwei abgewogene Proben des gut verrührten Kristallkuchens, zunächst mindestens 24 Stunden bei 37° C, sodann 1 Tag an der Luft getrocknet, fein pulverisiert, und nun das Trocknen im Glycerintrockenschrank bis zur Gewichtskonstanz fortgesetzt, und aus den verschiedenen Gewichten die Trockensubstanz berechnet.

Die Bestimmung des Brechungsexponenten geschah mittels eines *Pulfrich*schen Refraktometers, mit welchem man die Brechungsexponente bis fünf Dezimalstellen bestimmen kann. Da das Oxyhämoglobin die geringste Lichtabsorption im roten Teil des sichtbaren Spektrums, die stärkste aber im grünen und gelben hat, mußte ich die rote Linie  $H\alpha$  wählen, und von der exakten Messung der Dispersion absehen. Als Lichtquelle diente eine zum Instrument gehörige mit Wasserstoffgas gefüllte *Geissler*sche Röhre.

Sowohl *Stoddard* und *Adair*, wie *Howard* benutzten ein Instrument, das so justiert ist, daß es den Brechungsexponenten unmittelbar auf die *Fraunhofer*sche Linie  $D$  bezogen angibt. Nun habe ich in einigen Versuchen festgestellt, daß die Konstante „ $a$ “ eines Hämoglobinpräparates, durch ein ähnliches *Eintauchrefraktometer* ermittelt, dieselbe ist, bezogen „auf die *Fraunhofer*sche Linie  $D$ “, wie bei der von mir benutzten Linie  $H\alpha$ . Der weiter unten zu beschreibende Unterschied zwischen meinen Ergebnissen und denjenigen von *Howard* ist also nicht etwa als Dispersionseffekt anzusehen.

Die Ablesungen wurden bei 20° C ausgeführt (mit Hilfe der Heizeinrichtung konnte die Temperatur einige Stunden lang zwischen 19,9 bis 20,1° C gehalten werden). Von einem Präparat wurden wenigstens zwei Proben verschiedener Konzentration untersucht, und bei jeder Probe wurden wenigstens zwei Ablesungen gemacht, die innerhalb 1 Minute übereinstimmten; diese erzielte Genauigkeit äußert sich erst in der fünften Dezimalstelle des Brechungsexponenten; auf Grund von Angaben der Literatur<sup>1</sup> kann aber das als die besterreichbare Genauigkeit betrachtet werden. Um mich von der Zuverlässigkeit meines Instruments zu überzeugen, bestimmte ich den Brechungsexponenten einer 2 *Gramm*äquivalente enthaltenden  $KJ$ -Lösung; ich fand hierbei den Wert bei 18° C 1,372 16, der von dem in den *Landolt-Börnstein*schen Tabellen für die gleiche Lösung bei derselben Temperatur angegebenen (1,372 09) nur um 0,000 07 abweicht, also innerhalb der Fehlergrenzen liegt.

#### Besprechung der Versuchsergebnisse.

Bei kolloiden Lösungen gilt es als vielfach bewiesen, daß die Beziehung  $\frac{n_2 - n_1}{c} = a = \text{const}$ , die eine Umgestaltung der *Gladstone*-

<sup>1</sup> *Brailsford-Robertson*, Die physikalische Chemie der Proteine 1912, S. 322; ferner *Eisenlohr-Roth*, Refraktometrisches Hilfsbuch 1911, S. 85.

Daleschen Gleichung durch Vernachlässigen der Dichtedifferenz darstellt, den Tatsachen am besten gerecht wird, d. h. von der Konzentration des in Frage stehenden Kolloids unabhängig erscheint (und somit auch die refraktometrische Konzentrationsbestimmung der Eiweiße erlaubt). Die Werte für die Konstante „ $\alpha$ “ sind in den Tabellen II und III enthalten.

Tabelle II.

Tierart	Nr. des Präparats	n-te Kristallisation	Lösungsmittel*	100 cem Lösung enthält g Hgb.	Brechungs-exponent der Lösung	$10^5 \cdot \alpha$
Pferd	IV	1	W	1,545	1,33 407	197
			N	1,526	1,33 443	198
	IV	2	W	0,916	1,33 325	223
			A	1,474	1,33 456	227
	V	1	W	2,058	1,33 472	171
			A	3,882	1,33 774	168
	V	2	W	1,512	1,33 379	171
			N	2,904	1,33 617	171
	V	3	A	2,950	1,33 638	176
			W	1,639	1,33 431	189
	VI	1	A	2,076	1,33 525	194
			W	2,118	1,33 505	181
	VI	2	N	2,902	1,33 654	183
			A	3,628	1,33 782	189
	VI	3	W	1,572	1,33 398	176
			A	3,376	1,33 729	180
	VII	1	W	1,502	1,33 415	195
			N	2,204	1,33 564	199
	VII	2	A	2,696	1,33 654	198
			W	1,842	1,33 497	204
	VII	3	N	2,621	1,33 638	197
			W	1,696	1,33 442	190
	VIII	1	N	1,761	1,33 476	201
			A	2,098	1,33 526	193
	VIII	2	W	1,284	1,33 369	193
			A	1,431	1,33 400	189
	VIII	3	A	1,524	1,33 369	164
			A	1,232	1,33 361	194
	IX	1	A	1,441	1,33 403	195
			A	1,124	1,33 353	206
IX	2	A	1,099	1,33 354	212	
		A	2,840	1,33 683	198	
X	1	A	2,500	1,33 609	195	
		A	1,418	1,33 395	193	
XI	2	A	3,302	1,33 757	193	
		A	2,688	1,33 634	191	
XI	3	A	2,544	1,33 609	192	
		A	2,776	1,33 683	202	
XII	2	A	2,300	1,33 576	198	
		A	1,960	1,33 509	198	
Mittelwert der 3. und 4. Kristallisationen:						194

\* W = dest. Wasser; N = 0,1% Natriumhydrocarbonat; A = 0,1% Ammoniak.

Tabelle III\*.

Tierart	Nr. des Präparats	n-te Kristallisation	100 cem Lösung enthält g Hgb.	Brechungs-exponent der Lösung	10 <sup>5</sup> · $\alpha$	Bemerkungen	
Hund	I	1	2,770	1,336 73	199	Ohne Alkoholzusatz krist. Mit Alkoholzusatz krist.	
	I	2	2,050	1,335 34	201		
	II	1	2,558	1,336 50	206		
	II	2	2,372	1,336 18	210		
	III	1	3,240	1,337 66	199		
	III	1	3,502	1,338 25	201		
				Mittelwert:	203		
Rind	XI	1	1,221	1,333 70	204		
	XI	2	0,885	1,334 03	208		
	XIV	1	1,209	1,333 72	209		
	XV	1	2,179	1,335 67	206		
	XVI	1	2,302	1,336 09	212		
	XIX	2	3,720	1,339 25	215		
	XIX	3	3,780	1,339 08	208		
	XX	1	2,590	1,336 67	211		
				Mittelwert:	209		

Was den Einfluß des *Lösungsmittels* auf den Brechungsexponenten anlangt, geht aus Tabelle II hervor, daß die Refraktionskonstante „ $\alpha$ “ unverändert bleibt, gleichgültig ob das Oxyhämoglobin in Wasser, verdünntem Natriumhydrocarbonat oder verdünntem Ammoniak gelöst ist.

Es soll hingegen bemerkt werden, daß ein merklicher Einfluß des Lösungsmittels auf das spezifische Volumen festgestellt werden konnte, worüber nach Ergänzung diesbezüglicher Versuche berichtet werden soll.

Schon *Brailsford-Robertson*<sup>1</sup> wies darauf hin, daß die Substitution eines H-, oder OH-Radikals durch ein NH<sub>3</sub>- oder CO<sub>3</sub>-Radikal für das große Eiweißmolekül eine so geringfügige Änderung bedeutet, daß eine Wirkung desselben auf die Refraktionskonstante kaum zu erwarten ist.

Bezüglich des *Umkristallisierens* geht aus Tabelle II und III hervor, daß beim *Pferde* für die Refraktionskonstante erst nach der dritten Kristallisation mit Sicherheit konstante Werte erhalten werden können, während dies beim Rind und Hund bereits von der ersten Kristallisation an der Fall ist. Mit den bei Pferdehämoglobin gewonnenen Resultaten steht *Poljakows*<sup>2</sup> Beobachtung im Einklang, der bei seinen Aminosäurenbestimmungen im Pferdehämoglobinhydrolysat ebenfalls nur erst nach mehrmaligen Kristallisationen gut reproduzierbare Werte erhielt.

\* Die in dieser Tabelle enthaltenen Werte wurden ausschließlich an 0,1 % ig. ammoniakalischen Lösungen ermittelt.

<sup>1</sup> l. c. S. 319.

<sup>2</sup> Diese Zeitschr. 204, 88, 1928.

Schließlich geht aus meinen Ergebnissen mit Sicherheit hervor, daß die eingangs gestellte Frage, ob nämlich zwischen Hämoglobinen verschiedener Herkunft auch bezüglich des Brechungsexponenten ein Unterschied besteht, zu bejahen ist. *Die Unterschiede sind so ausgeprägt, daß die Schwankungsbereiche der auf die einzelnen Tierarten bezüglichen Bestimmungen nur in zwei Ausnahmefällen — die wohl als Versuchsfehler betrachtet werden können — übereinandergreifen.* Während beim Pferd sämtliche Werte zwischen 191 und 198 sind, fallen sie beim Hund zwischen die Grenzen von 199 und 206 (Präparat „Hund II, 2“ nicht mitgerechnet); beim Rind schließlich zwischen 206 und 215 (Präparat „Rind XI, 1“ nicht mitgerechnet). Die Mittelwerte sind der Reihe nach: beim Pferd 194, beim Hund 203 und beim Rind 209. (Die Präparate „Hund II, 2“ und „Rind XI, 1“ sind mitgerechnet.) Sie liegen also sämtlich über dem von *Howard* angegebenen Mittelwert, was ja auch mit den Befunden *Stoddards* und *Adairs* an Menschenhämoglobin im Einklang steht.

Es könnte der Einwand erhoben werden, daß die höheren Konstanten beim Rind und Hund davon herrühren, daß diese beiden Hämoglobinarten aus einer 33 %igen, das Pferdehämoglobin dagegen aus einer 12 %igen Alkohollösung auskristallisiert, und die bei den betreffenden Tierarten so erhaltenen höheren Werte auf einen etwaigen Einfluß des Alkohols zurückzuführen seien. Wenn dem so wäre, müßte die Refraktionskonstante des mit Alkoholzusatz hergestellten Oxyhämoglobins gegenüber dem durch bloßes Ausfrieren hergestellten Unterschiede aufweisen. Wie aber aus dem Versuch mit Hundehämoglobin III, das teils *mit*, teils *ohne* Alkohol auskristallisiert wurde, hervorgeht, *trifft dieser Einwand nicht zu.*

#### Anhang.

An drei Pferde- und zwei Rinderhämoglobinpräparaten habe ich die Hälfte der zu untersuchenden Lösungen mit reinem, aus Ameisensäure mit Schwefelsäure dargestelltem, gewaschenem CO-Gas gesättigt und den Brechungsexponenten der so erhaltenen CO-Hämoglobinlösungen gemessen.

Tabelle IV.

Tierart	Nr. des Präparats	nte Kristallisation	Brechungsexponent der O <sub>2</sub> -Hgb.-Lösung	Brechungsexponent der CO-Hgb.-Lösung
Pferd	VIII	2	1,331 21	1,331 21
	VIII	3	1,334 03	1,334 03
	IX	1	1,333 53	1,333 53
Rind	XI	2	1,333 05	1,333 05
	XIV	1	1,333 72	1,333 72

Aus der obigen Tabelle geht hervor, daß *zwischen dem CO-Hämoglobin und Oxyhämoglobin kein Unterschied des Brechungsexponenten besteht.*

**Zusammenfassung.**

1. Die Refraktionskonstante „ $a$ “ der Lösungen aus Pferde-, Hunde- und Rinderhämoglobin ist verschieden, und zwar beträgt sie beim Pferd 194, beim Hund 203 und beim Rind 209 ( $\lambda = 656,3 \text{ m}\mu$ , Linie  $H_\alpha$ ). 2. Daraus folgt, daß bei den Hämoglobinkonzentrationsbestimmungen der aus verschiedenen Tierarten gewonnenen Hämoglobin- bzw. Blutlösungen mit den für die betreffende Tierart angegebenen Konstanten gerechnet werden muß. 3. Oxyhämoglobinkristalle ergeben in Wasser, verdünntem Natriumhydrocarbonat oder verdünntem Ammoniak gelöst dieselbe Refraktionskonstante. 4. Einheitliche Refraktionskonstanten sind bei Pferdehämoglobin nur von der dritten Kristallisation aufwärts zu erhalten; beim Rind und Hund sind hingegen schon die ersten Kristallisationen einheitlich. 5. Der Brechungsexponent des CO-Hämoglobins entspricht dem des Oxyhämoglobins.

---

Über die Lichtabsorption  
von Oxy- und Kohlenoxydhämoglobin in neutraler Lösung.  
(Zugleich eine Richtigstellung.)

Von  
Wilma Sebesta und Alfred Herzog.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 27. Oktober 1933.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In einer früheren Arbeit hat der eine von uns (*V. Sebesta*) spektrophotometrische Untersuchungen über die Lichtabsorption von COHb mitgeteilt, die in *neutraler (wässriger) Lösung* ausgeführt worden waren<sup>1</sup>. Bald nach dem Bekanntwerden dieser Untersuchungen wurde das Institut von Herrn Prof. *Haurowitz* brieflich unter anderem darauf aufmerksam gemacht, daß außer den in der genannten Mitteilung angeführten Literaturangaben solche von *Newcomer* und *Kennedy* über die Lichtabsorption von COHb vorliegen, wobei es sich ebenfalls um spektrophotometrische Untersuchungen handelt, die sich mit seinen<sup>2</sup> und auch den spektrometrischen Angaben der Literatur decken, von den am hiesigen Institut gewonnenen und in obengenannter Arbeit mitgeteilten Ergebnissen aber wesentlich, und zwar sowohl in bezug auf *die Lage der Maxima* als auch *die Höhe der Kurve* (etwa um 12 bis 15%) abweichen. Nach *Newcomer*<sup>3</sup> würden die Maxima bei 570 und 538  $\mu\mu$ , nach *Kennedy*<sup>4</sup> bei 570 und 540  $\mu\mu$  liegen, Befunde, die sich also mit den später erwähnten spektrometrischen Daten der Literatur vereinbaren ließen, während am hiesigen Institut die Maxima bei 566 und 537  $\mu\mu$  gefunden worden waren, wobei bemerkt sei, daß unterdessen von dem anderen von uns (*A. Herzog*) am synthetischen COHb<sup>5</sup> in ebenfalls neutraler Lösung eine Lichtabsorptionskurve ermittelt wurde, die zu der hier am natürlichen festgestellten im wesentlichen *gleichlaufend* verlief.

Zu den erwähnten Unterschieden in den Versuchsergebnissen sei uns erlaubt anzuführen, daß a) *Newcomer* und *Kennedy* nicht mit krist. COHb, sondern mit Blutlösungen arbeiteten, in die die Autoren nicht CO-Gas, sondern Leuchtgas einführten; b) *Kennedy* die Lichtabsorption lediglich in Intervallen von 5 zu 5  $\mu\mu$  bestimmte, also an einer an den Maximen *ungenügenden* Zahl von Punkten; c) die Berechnung des *Hüfnerschen*

<sup>1</sup> *V. Sebesta*, diese Zeitschr. **260**, 187, 1933.

<sup>2</sup> *F. Haurowitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **151**, 133, 1926.

<sup>3</sup> *H. S. Newcomer*, J. of biol. Chem. **37**, 265, 1919.

<sup>4</sup> *R. P. Kennedy*, Amer. J. Physiol. **79**, 346.

<sup>5</sup> *A. Herzog*, diese Zeitschr. **264**, 423, 1933.



Quotienten bei *Newcomer* den Wert 1,15, bei *Kennedy* 1,19 ergibt, demnach Zahlen, die von dem von *Hüfner* angegebenen und von uns früher und jetzt wiederum gefundenen Werte von 1,10 zu stark abweichen; d) die Konzentration der untersuchten Lösung von *Newcomer* *kolorimetrisch*, von *Kennedy* *gasometrisch* nach *van Slyke*, in beiden Fällen also *indirekt* bestimmt wurde, während am hiesigen Institut die Konzentrationsbestimmung *gravimetrisch* vorgenommen wurde. (Daß die Ergebnisse der von den beiden Autoren verwendeten Methoden der Konzentrationsbestimmung mit jenen der gravimetrischen Methode differieren, ergibt sich aus einem Vergleiche der von den beiden Autoren am  $O_2Hb$  erhaltenen Daten mit jenen *P. Hári's*<sup>1</sup>, wobei sich ebenfalls teilweise bedeutende Differenzen zeigen, während Übereinstimmung zu erwarten wäre); e) im Gegensatz zu den genannten Autoren und auch *F. Haurowitz* im hiesigen Institut *nicht sodaalkalische, sondern neutrale Lösungen* von  $COHb$  untersucht wurden.

Teils zur Aufklärung der Differenzen unserer früheren Ergebnisse mit den angeführten Daten der Literatur, teils zur Nachprüfung unserer ehemaligen Untersuchungen haben wir letztere durch zwei Versuchsreihen ergänzt, in denen die Lichtabsorption von  $O_2Hb$  und  $COHb$  in neutraler Lösung an ein und demselben Versuchspräparat verglichen, die Lage der Maxima beim  $COHb$  an denselben Lösungen sowohl spektrophotometrisch als auch spektrometrisch untersucht und außerdem auf Einflüsse der Umkristallisation auf die Höhe der Lichtabsorption eingegangen wurde. Bei dieser Gelegenheit konnten auch die Abweichungen aufgeklärt werden, die sich zwischen den Lichtabsorptionskurven am natürlichen und synthetischen  $COHb$  an den beiden Punkten bei 585 und 576,6  $\mu\mu$  ergeben hatten<sup>2</sup>, an denen ehemals am natürlichen  $COHb$  die Werte *nachträglich* und nur an *einer* Lösung bestimmt worden waren.

#### Versuchsmethodik.

Für beide Versuchsreihen diente als Ausgangsmaterial kristallisiertes, nach *Willstätter-Pollinger* dargestelltes  $O_2Hb$  vom Pferd. Bei der *Versuchsreihe 1* wurde die eine Hälfte der wässrigen Lösung eines solchen Präparates durch Alkoholzusatz und Stehenlassen in einer Kältemischung in der üblichen Weise zweimal umkristallisiert und die wässrige Lösung der ersten Auskristallisation und jeder der beiden Umkristallisationen spektrophotometrisch untersucht (Tabelle I). In diese untersuchten  $O_2Hb$ -Lösungen wurde hierauf  $CO$ -Gas langsam perlend, unter öfterem vorsichtigen Umrühren 20 bis 30 Minuten lang eingeleitet und diese  $COHb$ -Lösung abermals der spektrophotometrischen Untersuchung unterworfen (Tabelle II). In der *Versuchsreihe 2* wurde die andere Hälfte der wässrigen Lösung kristallisierten  $O_2Hb$  durch Einleiten von  $CO$ -Gas sofort in  $COHb$  überführt, diese  $COHb$ -Lösung durch Zusatz von Alkohol und Stehenlassen in einer Kältemischung auskristallisiert und dieses kristallisierte  $COHb$  nach Lösen in destilliertem Wasser, abermaligem Einleiten von  $CO$ -Gas, durch Alkoholzusatz und Stehenlassen in einer Kältemischung noch zweimal umkristalli-

<sup>1</sup> *P. Hári*, diese Zeitschr. 82, 248, 1917.

<sup>2</sup> *A. Herzog*, l. c.

Tabelle I.

Mitte des Spektral- aus- schnittes $\mu\mu$	I. Kristallisation			II. Kristallisation			III. Kristallisation		
	Präparat		Mittel- wert	Präparat		Mittel- wert	Präparat		Mittel- wert
	I	II		I	II		I	II	
600,0	0,070	0,035	0,053	0,048	0,049	0,048	0,072	0,065	0,068
590,0	0,230	0,202	0,216	0,210	0,212	0,211	0,220	0,223	0,221
585,0	0,422	0,424	0,423	0,406	0,413	0,409	0,405	0,407	0,406
580,0	0,676	0,688	0,682	0,655	0,685	0,670	0,652	0,667	0,659
578,0	0,764	0,763	0,763	0,738	0,765	0,751	0,722	0,748	0,735
576,0	0,815	0,822	0,818	0,781	0,819	0,807	0,762	0,793	0,777
575,0	0,826	0,822	0,824	0,785	0,842	0,813	0,761	0,801	0,780
574,0	0,826	0,810	0,818	0,783	0,832	0,807	0,746	0,794	0,770
570,0	0,740	0,731	0,735	0,694	0,731	0,712	0,668	0,708	0,688
566,0	0,617	0,596	0,607	0,566	0,598	0,582	0,557	0,577	0,567
560,8	0,511	0,485	0,498	0,458	0,493	0,475	0,467	0,483	0,475
558,0	0,501	0,480	0,490	0,438	0,471	0,454	0,440	0,451	0,445
556,0	0,503	0,470	0,486	0,449	0,488	0,468	0,449	0,464	0,456
551,0	0,582	0,558	0,570	0,505	0,556	0,530	0,511	0,527	0,519
545,0	0,742	0,710	0,726	0,682	0,729	0,705	0,630	0,661	0,645
542,0	0,806	0,765	0,785	0,730	0,784	0,757	0,681	0,709	0,695
541,0	0,803	0,774	0,788	0,724	0,786	0,755	0,687	0,712	0,699
540,0	0,804	0,772	0,788	0,724	0,778	0,751	0,674	0,711	0,692
537,4	0,796	0,764	0,780	0,689	0,775	0,732	0,668	0,688	0,678
535,0	0,771	0,731	0,750	0,645	0,746	0,695	0,647	0,666	0,656
527,0	0,554	0,540	0,547	0,521	0,549	0,535	0,506	0,517	0,511
520,0	0,388	0,381	0,384	0,434	0,395	0,414	0,406	0,392	0,399

Tabelle II.

Mitte des Spektral- aus- schnittes $\mu\mu$	I. Kristallisation			II. Kristallisation			III. Kristallisation		
	Präparat		Mittel- wert	Präparat		Mittel- wert	Präparat		Mittel- wert
	I	II		I	II		I	II	
593,4	0,121	0,135	0,128	0,122	0,118	0,120	0,091	0,116	0,108
585,0	0,250	0,266	0,258	0,249	0,244	0,246	0,214	0,229	0,221
576,6	0,506	0,544	0,525	0,507	0,507	0,503	0,460	0,445	0,452
573,5	0,622	0,663	0,642	0,634	0,606	0,620	0,574	0,550	0,562
570,5	0,716	0,759	0,737	0,718	0,721	0,719	0,660	0,644	0,652
569,0	0,745	0,798	0,771	0,753	0,743	0,748	0,689	0,672	0,680
567,5	0,770	0,816	0,793	0,762	0,762	0,762	0,715	0,694	0,704
566,0	0,773	0,839	0,806	0,774	0,766	0,770	0,715	0,702	0,708
563,3	0,761	0,827	0,794	0,776	0,747	0,761	0,695	0,689	0,692
560,8	0,723	0,771	0,747	0,731	0,703	0,717	0,661	0,661	0,661
556,6	0,665	0,716	0,690	0,684	0,656	0,670	0,608	0,612	0,610
554,2	0,658	0,691	0,674	0,658	0,627	0,642	0,593	0,604	0,598
551,7	0,643	0,695	0,669	0,652	0,622	0,635	0,592	0,601	0,596
549,2	0,658	0,702	0,680	0,672	0,634	0,653	0,607	0,608	0,607
544,7	0,710	0,759	0,734	0,705	0,681	0,693	0,651	0,659	0,655
540,2	0,772	0,826	0,799	0,775	0,751	0,763	0,719	0,720	0,719
538,0	0,801	0,838	0,818	0,793	0,775	0,784	0,734	0,714	0,724
537,4	0,801	0,863	0,833	0,796	0,774	0,785	0,731	0,738	0,734
534,8	0,786	0,851	0,818	0,799	0,783	0,791	0,748	0,735	0,741
527,7	0,692	0,729	0,710	0,695	0,660	0,677	0,645	0,649	0,647
509,2	0,344	0,403	0,373	0,340	0,366	0,353	0,352	0,377	0,364

Tabelle III.

Mitte des Spektral- aus- schnittes <i>uu</i>	I. Kristallisation			II. Kristallisation			III. Kristallisation		
	Präparat		Mittel- wert	Präparat		Mittel- wert	Präparat		Mittel- wert
	I	II		I	II		I	II	
593,4	0,120	0,117	0,118	0,125	0,105	0,115	0,121	0,118	0,119
585,0	0,262	0,258	0,260	0,260	0,238	0,249	0,255	0,256	0,255
576,6	0,539	0,516	0,527	0,522	0,503	0,512	0,513	0,527	0,520
573,5	0,664	0,636	0,650	0,657	0,616	0,636	0,621	0,650	0,635
570,5	0,757	0,767	0,762	0,752	0,729	0,740	0,715	0,744	0,729
569,0	0,798	0,778	0,788	0,783	0,753	0,768	0,745	0,782	0,763
567,5	0,821	0,796	0,808	—	0,773	0,773	0,772	0,798	0,785
566,0	0,830	0,800	0,815	0,803	0,775	0,789	0,802	0,807	0,804
563,3	0,817	0,779	0,798	0,792	0,757	0,774	0,786	0,793	0,789
560,8	0,779	0,742	0,760	0,759	0,729	0,744	0,743	0,748	0,745
556,6	0,709	0,680	0,694	0,684	0,669	0,676	0,686	0,691	0,688
554,2	0,689	0,656	0,672	0,681	0,646	0,663	0,662	0,662	0,662
551,7	0,674	0,653	0,663	0,665	0,634	0,649	0,645	0,663	0,654
549,2	0,692	0,670	0,681	0,677	0,640	0,658	0,660	0,670	0,665
544,7	0,738	0,723	0,730	0,742	0,709	0,725	0,729	0,731	0,730
540,2	0,813	0,786	0,794	0,799	0,783	0,791	0,790	0,799	0,794
538,0	0,823	0,811	0,817	0,818	0,804	0,801	0,812	0,824	0,818
537,4	0,835	0,806	0,820	0,805	0,816	0,810	0,805	0,818	0,811
534,8	0,827	0,804	0,815	0,811	0,792	0,801	0,797	0,821	0,809
527,7	0,707	0,693	0,700	0,701	0,688	0,694	0,699	0,703	0,701
509,2	0,365	0,356	0,360	0,391	0,362	0,376	0,402	0,350	0,376

siert. Die wässrigen Lösungen jeder dieser Kristallisationen von COHb wurden spektrophotometrisch (Tabelle III) und gleichzeitig auch spektrometrisch untersucht. CO-Gas wurde hier vor der ersten Auskristallisation  $\frac{1}{2}$  Stunde und vor jeder Umkristallisation  $\frac{1}{4}$  Stunde eingeleitet. Alle untersuchten Lösungen waren klar.

Die Bestimmung der Konzentration der untersuchten Lösungen und die spektrophotometrischen Untersuchungen wurden in der früher beschriebenen Weise ausgeführt<sup>1</sup>. Bemerkte sei, daß das verwendete Spektrophotometer vor 3 Jahren in derselben Werkstätte, in der es ehemals erzeugt worden war, neu justiert und nach dem Vorgange von G. Neumann<sup>2</sup> neu kalibriert wurde. Das CO-Gas war wie früher gewonnen<sup>1</sup>, bei diesen Untersuchungen aber nicht in einer Waschflasche mit destilliertem Wasser, sondern in einer solchen mit 5%iger NaOH gewaschen worden. Die bei den spektrophotometrischen Untersuchungen gewonnenen Werte sind in die Tabellen als spezifische Extinktionskoeffizienten eingetragen.

Zu den spektrometrischen Untersuchungen diente ein Zeissches Gitterspektroskop, dessen Kalibrierung neu nachgeprüft worden war.

### Versuchsergebnisse.

#### 1. Lage der Maxima.

Beim O<sub>2</sub>Hb (Tabelle I) ergeben sich die Maxima bei 575,2 und 541,3  $\mu\mu$  und das fälschlich so genannte Minimum bei 557,5  $\mu\mu$ .

<sup>1</sup> V. Sebesta, l. c.

<sup>2</sup> G. Diese Zeitschr. 208, 248, 1932.

*P. Hári* fand die Maxima von O<sub>2</sub>Hb bei Untersuchung in neutraler und sodaalkalischer Lösung gleich gelegen und gibt, übereinstimmend mit uns, aus seinen zahlreichen Untersuchungen die Maxima im Mittel bei 575,6 und 540,4 und das Minimum bei 558,1  $\mu\mu$  an<sup>1</sup>. Mit dieser Lage der Maxima beim O<sub>2</sub>Hb decken sich auch die bekannt gewordenen spektrophotometrischen Untersuchungen anderer Autoren, *Newcomer*, l. c., *Kennedy*, l. c.

Die spektrophotometrischen Untersuchungen am COHb (Tabelle II und III) zeigen in Übereinstimmung mit unseren früheren Befunden an natürlichen und synthetischen COHb durchwegs die Maxima bei 566 und 537  $\mu\mu$  und das Minimum bei 551  $\mu\mu$ .

Mit diesen Ergebnissen decken sich noch am ehesten die Angaben von *Hagenbach* und *Strub*<sup>2</sup>, die bei ebenfalls spektrophotometrischer Untersuchung die Maxima bei 567,5 und 538  $\mu\mu$  fanden; es läßt sich aber gegen diese Untersuchungen, abgesehen davon, daß die genannten Autoren ebenfalls mit Blutlösungen arbeiteten, noch der Einwand erheben, daß die verwendeten Lösungen trüb waren.

Trotzdem unsere Versuchsanordnung und die Konstanz unserer Versuchsergebnisse an der Richtigkeit der von uns gefundenen Lage der Maxima nicht zweifeln ließ, haben wir zu ihrer näheren Charakterisierung die in der Versuchsreihe 2 verwendeten Lösungen auch *spektrometrisch* untersucht und die so festgestellten Maxima (Mitte der Streifen) in der folgenden Zusammenstellung gleichzeitig mit den in der Literatur bekannten Angaben angeführt.

Präparat	Kristallisation	$\alpha$ -Streifen	$\beta$ -Streifen
I	I	bei 571,1 $\mu\mu$	bei 535,6 $\mu\mu$
I	II	" 570,5 "	" 536,0 "
I	III	" 571,1 "	" 535,5 "
II	I	" 571,1 "	" 535,6 "
II	II	" 572,1 "	" 536,1 "
II	III	" 571,6 "	" 536,0 "
Mittelwert:		571,2 $\mu\mu$	535,8 $\mu\mu$
Gefunden von:			
<i>Hoppe-Seyler</i> * . . .		bei 572 $\mu\mu$	bei 536 $\mu\mu$
<i>Lewin, Miethé</i> und			
<i>Stenger</i> ** . . . .		" 570 "	" 542 "
<i>Jäderholm</i> *** . . . .		" 569 "	" 534 "
<i>Formánek</i> † . . . .		" 571 "	" 537,4 "

\* *F. Hoppe-Seyler*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 496, 1889; zit. nach *Hoppe-Seyler-Thierfelders* Handb. d. physiol. u. pathol.-chem. Analyse, 12. Aufl., 1924, S. 527.

\*\* *L. Lewin, A. Miethé u. E. Stenger*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 118, 80, 1907.

\*\*\* *A. Jäderholm*, Nordisk, medicinsk Archiv 6, Nr. 11 u. 12; zit. nach Jahresber. f. Tierchem. 4, 102, 1874.

† *J. Formánek*, Zeitschr. f. anal. Chem. 40, 501, 1901; zit. nach Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. 6, 118, 1928.

<sup>1</sup> *P. Hári*, diese Zeitschr. 82, 250, 1917; 95, 262, 1919.

<sup>2</sup> *A. Hagenbach u. J. Strub*, Arch. de la soc. phys. et nat. 7, 222, 1925; zit. nach Ber. ü. d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. 37, 133, 1926.

Aus der Übereinstimmung der Ergebnisse unserer spektrometrischen Untersuchungen mit jenen der Literatur, weiterhin aus der Übereinstimmung unserer spektrophotometrischen Untersuchungen am  $O_2Hb$  mit jenen anderer Autoren dürfen wir folgern, daß *die von uns angegebene Lage der Maxima des COHb bei spektrophotometrischer Untersuchung richtig ist*. Daß derartige Differenzen zwischen spektrometrischer und spektrophotometrischer Untersuchung wie beim  $\alpha$ -Streifen auftreten können, ist bekannt (*H. Gombos*<sup>1</sup>) und ist hier sehr schön aus dem Kurvenverlauf am  $\alpha$ -Streifen zu erklären (s. Abb.).

## 2. Höhe der spezifischen Extinktionskoeffizienten an den Maximen.

Im Gegensatz zur Lage der Maxima fand nun *P. Hári* beim  $O_2Hb$  in der Höhe der spezifischen Extinktionskoeffizienten *Abweichungen*, je nachdem er in *neutraler oder sodaalkalischer Lösung untersuchte*, und zwar waren die Werte bei Untersuchungen in ersterer vornehmlich am Minimum zwischen den beiden Streifen und am Maximum des  $\beta$ -Streifens im Mittel um  $1\frac{1}{2}$  bis 2% tiefer, wobei aber die Differenzen ziemlich Schwankungen unterlagen. Im Gegensatz zur Untersuchung in sodaalkalischer Lösung waren so die spezifischen Extinktionskoeffizienten am Maximum des  $\beta$ -Streifens tiefer als an dem des  $\alpha$ -Streifens<sup>2</sup>. Diese geringere Absorption am  $\beta$ -Streifen bei Untersuchung in neutraler Lösung bezog *P. Hári* auf Übergang in Methämoglobin, da der Autor bei Untersuchung von  $O_2Hb$  in neutraler Lösung eine stärkere Absorption im Rot feststellte als bei Untersuchung in sodaalkalischer Lösung. Dieser Auffassung können wir uns nicht anschließen, da bei Übergang in Methämoglobin außer stärkerer Absorption im Rot umgekehrt eine ausgiebigere Senkung der Lichtabsorption am  $\alpha$ -Streifen als am  $\beta$ -Streifen und außerdem eine Violettverschiebung der Maxima zu erwarten ist. Des weiteren erwähnt derselbe Autor, daß der  $\beta$ -Streifen verändernden Einflüssen gegenüber empfindlicher ist und sich rascher senkt als der  $\alpha$ -Streifen<sup>2</sup>. Mit diesen Angaben *P. Háris* stimmen unsere Ergebnisse am  $O_2Hb$  überein (Tabelle I); es liegen in der ersten Kristallisation die Werte innerhalb der von dem genannten Autor gefundenen Grenzwerte, und zwar liegt das Maximum des  $\beta$ -Streifens gegenüber dem des  $\alpha$ -Streifens bei Präparat 1 um  $2\frac{1}{2}$ , bei Präparat 2 um 6% tiefer. Beim Präparat 1 tritt schon in der zweiten, beim Präparat 2 erst in der dritten Kristallisation eine erhebliche Senkung der ganzen Kurve ein, die wohl auf Einflüsse bei der Umkristallisation und Aufbewahrung zurückgeführt werden darf und beim  $\beta$ -Streifen *stärker* in Erscheinung tritt als beim  $\alpha$ -Streifen.

Die spezifischen Extinktionskoeffizienten der COHb-Lösungen der Tabelle II zeigen an den Maximen ungefähr die *gleiche* Höhe wie die der entsprechenden  $O_2Hb$ -Lösungen, doch weist hier das Maximum des  $\beta$ -Streifens im Gegensatz zu letzteren höhere Werte auf als das des  $\alpha$ -Streifens, und es tritt hier die Senkung bei der zweiten und dritten Kristallisation ebenfalls gegensätzlich zu dem Verhalten der  $O_2Hb$ -Lösungen an beiden Streifen und am Minimum zwischen den beiden Streifen gleichmäßig auf.

<sup>1</sup> *H. Gombos*, diese Zeitschr. 151, 11, 1924.

<sup>2</sup> *P. Hári*, ebenda 95, 260, 1919; 82, 276, 1917.

Da für die einander entsprechenden Präparate und Kristallisationen in den Tabellen I und II die gleichen Konzentrationswerte gelten, der Versuchsfehler bei getrennter Konzentrationsbestimmung also wegfällt, und die spezifischen Extinktionskoeffizienten der ersten Kristallisation am  $O_2Hb$  mit jenen *P. Hári's* übereinstimmen, dürfen wir folgern, daß die Werte der *COHb-Lösungen in Tabelle II, die durch Einleiten von CO-Gas in die Lösungen erster Kristallisation von  $O_2Hb$  hergestellt worden waren, die richtige Höhe der Lichtabsorption des COHb bei Untersuchung in neutraler Lösung* wiedergeben. Die tieferen Werte der zweiten und dritten Kristallisation erklären sich aus den ebenfalls tieferen Werten der gleichen Kristallisationen von  $O_2Hb$ .

In der gleichen Weise zeigen auch die *COHb-Lösungen* der Versuchsreihe 2 (Tabelle III) am Maximum des  $\beta$ -Streifens höhere Werte als am  $\alpha$ -Streifen. Die Höhe der spezifischen Extinktionskoeffizienten bleibt hier aber *durch alle drei Kristallisationen gleich* und entspricht jener der ersten Kristallisation in Tabelle II. Es scheint demnach das kristallisierte *COHb* gegenüber den die Extinktion verändernden Einflüssen *widerstandsfähiger* zu sein als  $O_2Hb$ .

Ein Vergleich der früheren Präparate 3 vom Pferd und Präparate I und 3 vom Rind von natürlichem *COHb\** mit diesen neueren Untersuchungen ergibt in bezug auf Höhe der spezifischen Extinktionskoeffizienten Übereinstimmung. Die übrigen Präparate hingegen weisen an den Maximen gegenüber den neueren Untersuchungen durchwegs etwas zu tiefe Werte auf, so daß der Unterschied an den Maximen bei den Präparaten vom Pferd mit den neuen Untersuchungen im Mittel 5% beträgt. Die Mittelwerte der drei Präparate vom Rind aber entsprechen, abgesehen von einer unbedeutenden Differenz am Maximum des  $\alpha$ -Streifens, im wesentlichen den neuen Untersuchungen, die am Pferd ausgeführt worden waren. *Ein Unterschied in der Höhe der Lichtabsorption beim COHb zwischen Pferd und Rind, wie er aus den früheren Untersuchungen hervorzugehen schien, ist somit nicht nachweisbar.* Die Ursache der oben genannten Differenz von 5% darf vielleicht auf einen Einfluß flüchtiger Ameisensäure bei der *CO-Gasdarstellung* bezogen werden, das bei den früheren Untersuchungen, wie erwähnt, nicht durch Lauge, sondern durch destilliertes Wasser gewaschen worden war. Gegenüber unseren neueren Untersuchungen liegen aber die Werte von *Newcomer* (l. c.), *Kennedy* (l. c.) und *Haurowitz*<sup>1</sup> immer noch um einige Prozent höher. Wir glauben nicht fehlzugehen, wenn wir die Ursache dieser Unterschiede im Rahmen der früher erwähnten Einwände vornehmlich in der Reaktion des Lösungsmittels erblicken, das in unserem Falle neutral, bei den genannten Autoren aber sodaalkalisch war, wobei auf *ähnliche Unterschiede bei den anderen Hämoglobinmodifikationen* hingewiesen sei<sup>2</sup>.

Der graphischen Darstellung der Lichtabsorption von *COHb* waren bei den früheren Untersuchungen irrtümlicherweise an Stelle der richtigen

\* *V. Sebesta*, l. c.

<sup>1</sup> *F. Haurowitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 151, 133, 1926.

<sup>2</sup> Spektrophotometrische Untersuchungen sodaalkalischer Lösungen von *COHb* werden im Zusammenhang mit einer anderen Arbeit von einem Institutskollegen mitgeteilt.

Mittelwerte der Präparate vom Rind die um 5% zu tiefen Mittelwerte vom Pferd zugrunde gelegt und diese Kurve überdies mit der Lichtabsorptionskurve von  $O_2Hb$  in sodaalkalischer Lösung von *P. Hári* statt mit einer solchen in neutraler Lösung verglichen worden.

Auf der neuen Abbildung stellt nun die Kurve I die Lichtabsorption des  $O_2Hb$ , die Kurve II die des  $COHb$ , beide in neutraler Lösung, dar, wobei zu diesen beiden Kurven in richtiger Weise die Mittelwerte der ersten Kristallisation der Tabellen I und II verwendet wurden. Die

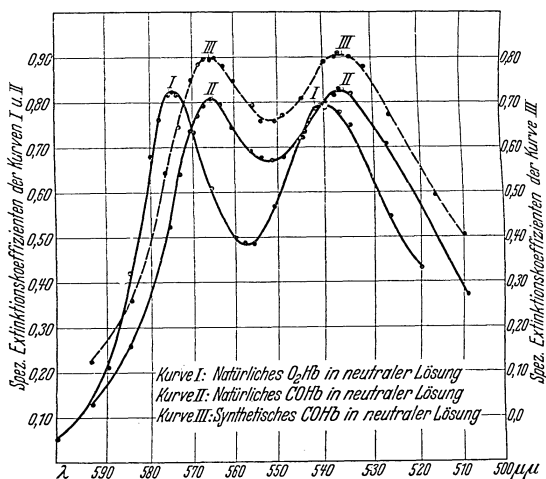


Abb. 1.

Lage der beiden Kurven entspricht den von *Rost, Franz und Heise* spektrographisch festgestellten Unterschieden in der Lichtabsorption von  $O_2Hb$  und  $COHb$ <sup>1</sup>. Wie die frühere, so zeigt auch diese Kurve von  $COHb$  keine ausgesprochene Maximen, sondern flache Kuppen. Die gestrichelte Kurve III, die gegenüber den beiden anderen nach oben verschoben ist, stellt die Lichtabsorptionskurve synthetischen  $COHb$  dar, die in der gleichen Weise, wie früher, auf die Werte der neuen Kurve natürlichen  $COHb$  umgerechnet wurde<sup>2</sup> und zu der jetzt auch die Kurve des natürlichen  $COHb$  an den beiden Punkten bei 585 und 576,6  $\mu\mu$  gleichlaufend verläuft.

### 3. Hüfnerscher Quotient.

Den geäußerten Auffassungen über die Lichtabsorption von  $O_2Hb$  und  $COHb$  entsprechen auch die *Hüfnerschen* Quotienten, die in der folgenden Zusammenstellung angegeben sind:

<sup>1</sup> *Rost, Franz u. Heise*, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 32, 1909.

<sup>2</sup> *A. Herzog*, l. c.

Kristallisation	Tabelle I (O <sub>2</sub> Hb)		Tabelle II (COHb)		Tabelle III (COHb)	
	Präparat I	Präparat II	Präparat I	Präparat II	Präparat I	Präparat II
I	1,56	1,57	1,11	1,12	1,07	1,09
II	1,50	1,57	1,08	1,10	1,06	1,12
III	1,43	1,42	1,11	1,12	1,09	1,09

Die Quotienten der ersten Kristallisation von Präparat I und der ersten und zweiten Kristallisation von Präparat II von O<sub>2</sub>Hb liegen im Rahmen der von früheren Autoren sowohl bei sodaalkalischer als auch neutraler Lösung gewonnenen und bekannten Werte<sup>1</sup>, die anderen drei sind Ausdruck der am  $\beta$ -Streifen stärkeren Abnahme der Lichtabsorption. Daß sich beim *Hüfnerschen* Quotienten zwischen sodaalkalischer und neutraler Lösung von O<sub>2</sub>Hb keine nennenswerte Differenz ergibt, erklärt sich aus dem prozentual ziemlich gleichen Unterschied in der Lichtabsorption an den *Hüfnerschen* Stellen in derartigen Lösungsmitteln.

Die Quotienten der Untersuchungen über das COHb zeigen ungefähr die gleichen Werte und *ergeben den verlangten Mittelwert von 1,10*. Die gleichbleibenden Werte aus der Tabelle II im besonderen und die Werte der früheren Untersuchungen vom Pferd, die trotz der um 5% niedrigeren Kurve auf den richtigen Wert von 1,10 lauteten, erklären sich *aus der gleichmäßigen Senkung der ganzen Kurve*. Infolgedessen gilt für den *Hüfnerschen* Quotienten des COHb die Einschränkung, daß *der Wert von 1,10 nur ein Charakteristikum der richtigen Lage, nicht aber gleichzeitig auch der richtigen Höhe der Kurve darstellt*.

#### 4. Absorptionsverhältnis.

Für das *Absorptionsverhältnis (Vierordt)* müssen sich beim O<sub>2</sub>Hb im Einklang mit der Tatsache, daß die spezifischen Extinktionskoeffizienten bei Untersuchung in neutraler Lösung im Zwischenraum zwischen den beiden Maximen und am Maximum des  $\beta$ -Streifens — daher auch an den *Hüfnerschen* Stellen, an denen ja das Absorptionsverhältnis berechnet wird — tiefere Werte zeigen als bei Untersuchung in sodaalkalischer Lösung, umgekehrt bei Untersuchung in neutraler Lösung höhere Werte ergeben als bei Untersuchung in letzterer. In Übereinstimmung mit dieser Voraussetzung führt die Berechnung aus den Versuchsergebnissen der beiden Präparate der ersten Kristallisation in Tabelle I an der Spektralstelle 560,8  $\mu\mu$  zu einem Mittelwert für das Absorptionsverhältnis von 0,00201, an der Spektralstelle 537,4  $\mu\mu$  zu einem solchen von 0,00129. Bei Untersuchung in sodaalkalischer Lösung fand *P. Hári*<sup>2</sup> die Werte 0,00188 bzw. 0,00117, *E. E. Butterfield*<sup>3</sup> 0,00187 bzw. 0,00119, *Hüfner* hingegen 0,00207 und 0,00131.

<sup>1</sup> *P. Hári*, diese Zeitschr. 82, 263, 1917; 95, 260, 1919.

<sup>2</sup> *P. Hári*, ebenda 82, 254, 1917.

<sup>3</sup> *E. E. Butterfield*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 1909.



Für das COHb in neutraler Lösung berechneten wir unter Zugrundelegung der Untersuchungsergebnisse der ersten Kristallisation in Tabelle II und sämtlicher Kristallisationen in Tabelle III für das Absorptionsverhältnis an der Spektralstelle 560,8  $\mu\mu$  den Wert 0,00133 (Schwankungsbreite von 0,00128 bis 0,00138) und an der Spektralstelle 537,4  $\mu\mu$  den Wert 0,00122 (Schwankungsbreite von 0,00116 bis 0,00124). *Hüfner* fand die Werte 0,00138 und 0,00126. Die in der früheren Arbeit des einen von uns angegebenen Werte von 0,00143 und 0,00130\* erklären sich aus der damals erfolgten irrtümlichen Zugrundelegung der erwähnten zu tiefen spezifischen Extinktionskoeffizienten.

---

\* *V. Sebesta*, l. c.

## Über ein mit Ameisensäure dargestelltes Hämin.

Von

Josef Brückner.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 2. Dezember 1933.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Im Jahre 1920 beschrieb *Partos*<sup>1</sup> aus dem hiesigen Institut eine von ihm kristallinisch dargestellte hämatinartige Substanz, die er durch Extraktion des Blutkoagulums mit ameisen-saurem Methylalkohol und folgendem Erhitzen auf dem Wasserbad hergestellt hatte. In dieser Verbindung wurde später von *Küster*<sup>2</sup> Ameisensäure und Methoxyl nachgewiesen und die Verbindung so als ein *monomethyliertes Formylhydroxyhämin* angesprochen.

In der Folge hatte auch *Küster*<sup>2</sup> versucht, verschiedene andere Formyl-derivate des Blutfarbstoffes herzustellen, doch wiesen diese in der Regel einen gewissen Chlorgehalt auf, der wohl in Zusammenhang mit dem im Blute vorhandenen Chlorgehalt gebracht werden kann. Des weiteren befaßten sich mit Formyl-derivaten der eisenhaltigen Komponente des Blutfarbstoffes *Hamsik*<sup>3</sup> und *Šula*<sup>4</sup>, doch findet sich bei diesen Autoren kein exakter Nachweis des Vorhandenseins von Ameisensäure.

Gelegentlich von Studien, die ich an dem nach *Partos*<sup>1</sup> dargestellten Formylhydroxyhämin vornahm, machte ich die Beobachtung, daß sich aus dem noch kalten ameisen-sauren methyl- oder äthylalkoholischen Extrakte des Blutkoagulums ebenfalls Kristalle ausscheiden. Diese kristallisierte Substanz habe ich einer eingehenderen Untersuchung unterworfen, über die ich nun in der vorliegenden Mitteilung berichten will.

### Darstellung und Beschreibung der Substanz.

Pferdeblut oder gelöstes, kristallisiertes Pferdeoxyhämoglobin<sup>5</sup> wurde nach Zusatz von etwa 1 g Natriumsulfat pro Liter in der Hitze koaguliert,

<sup>1</sup> *S. Partos*, diese Zeitschr. **105**, 49, 1920. — <sup>2</sup> *W. Küster* u. *A. Gerlach*, Hoppe-Seylers Zeitschr. **119**, 98, 1922; *W. Küster* u. *E. Willig*, ebenda **129**, 130, 1923. — <sup>3</sup> *A. Hamsik*, ebenda **169**, 67, 1927; **183**, 103, 1929; **190**, 199, 1930; Spisy lék. Fak. Masaryk. Univ. Brno **7**, H. 61—69, 123, 1929; **8**, H. 74, 1, 1930. — <sup>4</sup> *J. Šula*, ebenda **8**, H. 79, 1, 1930; Hoppe-Seylers Zeitschr. **188**, 274, 1930. — <sup>5</sup> Das verwendete O<sub>2</sub>Hb wurde abweichend von den sonstigen Methoden wie folgt dargestellt: Blutkörperchen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung mehrmals in der Zentrifuge gewaschen und durch Zugabe der gleichen Menge destillierten Wassers und Schütteln Hämolyse herbeigeführt. Dieser hämolysierten Blut-

das Koagulum fest abgepreßt, mit Alkohol mehrmals gewaschen und mit 3 bis 4 % konz. Ameisensäure enthaltendem Alkohol extrahiert. Bei Verwendung von Äthylalkohol mußte die Extraktion sehr rasch beendet werden, da die Ausscheidung der Kristalle sehr rasch begann. Bei Benutzung von Methylalkohol ging die Ausscheidung der Kristalle etwas langsamer vonstatten. Der Extrakt wird durch ein Wattefilter filtriert und hierauf bei Zimmertemperatur 2 Tage stehengelassen. Bis zu dieser Zeit haben sich die Kristalle am Boden des Gefäßes abgesetzt, und es wird hierauf die Mutterlauge dekantiert, der Rest der Mutterlauge abgenutscht, der Kristallbrei ebenfalls in der Nutsche mit dem verwendeten reinen Alkohol mehrmals gewaschen und im Schwefelsäureexsikkator getrocknet. Die Rohausbeute pro Liter Blut betrug 1,3 g.



Abb. 1.

Bei der *Umkristallisation* ging ich in der Weise vor, daß ich 1 g Rohsubstanz in einer Pyridin-Chloroformmischung (3,5 ccm Pyridin und 5 ccm Chloroform) löste und die filtrierte Lösung langsam in 100 ccm 10 % Ameisensäure enthaltenden Alkohol eingoß. Nachdem ich nachher noch etwa 15 ccm konz. Ameisensäure zugefügt hatte, ließ ich 48 Stunden stehen. Da bis zu dieser Zeit die Kristallabscheidung beendet war, dekantierte ich die aufgehellte Mutterlauge, nutschte wieder ab, wusch ebenfalls in der Nutsche zuerst mit dem verwendeten reinen Alkohol, nachher mit destilliertem Wasser und, um die Trocknung zu beschleunigen, nochmals mit Alkohol. Die Kristalle wurden dann wieder im Schwefelsäureexsikkator getrocknet. Ausbeute aus 1 g Rohsubstanz 0,7 g umkristallisierte Substanz.

lösung wurde nach Abkühlung unter 5° C ein Sechstel Volumen eisgekühlten Alkohols unter dauerndem Umrühren langsam zugesetzt und in einer Kältemischung stehengelassen. In den drei folgenden Tagen wurde jedesmal die ausgefrorene O<sub>2</sub>Hb-Masse mit einem Glasstabe umgerührt und nachher jeweils die Kältemischung erneuert. Nach 3 Tagen hatten sich die Kristalle am Boden des Gefäßes abgesetzt, während sich die Stromata an der Oberfläche der Mutterlauge angesammelt hatten, die dann mit der Mutterlauge dekantiert werden konnten. Der Kristallbrei wurde abgenutscht, mit eisgekühltem Wasser gewaschen und weiter verwendet.

Die Substanz kristallisiert in durchschnittlich 1,5 mm langen Säulen, die unter dem Mikroskop sechskantig und schief abgeschnitten erscheinen, und teils einzeln, teils zu büschelartigen Gebilden vereint anzutreffen sind (s. Abb. 1).

Die Substanz ist gut löslich in wässrigen oder alkoholischen Laugen, 5%iger Sodalösung, Pyridin und einem Pyridinchloroformgemisch, schwach löslich in kaltem und warmem säurehaltigen Methyl- und Äthylalkohol, und unlöslich in kaltem und warmem reinen Methyl- oder Äthylalkohol, Chloroform, Äther, verdünnten Mineralsäuren und Aceton. Ein Schmelzpunkt konnte nicht ermittelt werden. Die Substanz blieb bis zu 260° C unverändert.

Die Substanz konnte durch Erhitzen mit NaCl und Eisessig unter dem Deckglas in typische Teichmannsche Kristalle überführt werden. Desgleichen konnte ich aus nach Schälfejeff dargestelltem Hämin, indem ich letzteres in einem Pyridin-Chloroformgemisch löste und in mit Ameisensäure versetzten Alkohol (wie unter Umkristallisation beschrieben) einführte, zu denselben Kristallen gelangen, deren Darstellung ich oben beschrieben habe.

#### Analysen.

Die Analysen wurden am medizinisch-chemischen Institut der Universität Graz von Herrn Dr. M. K. Zacherl ausgeführt, wofür ihm an dieser Stelle bestens gedankt sei. Die Präparate<sup>1</sup> wurden vor der Analyse bei 100° C im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. N wurde nach Dumas-Pregl bestimmt. Eine vorsichtshalber ausgeführte Cl-Bestimmung nach Carius hatte ein negatives Ergebnis.

Präparat	Substanz mg	H <sub>2</sub> O mg	CO <sub>2</sub> mg	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> mg	Substanz mg	N cem	t°	p
I	4,860	2,20	11,33	0,575	3,988	0,301	18	731
	4,557	2,17	10,61		4,801	0,364	23	738
II	4,462	2,03	10,38	0,504	3,514	0,270	17	731
	3,771	1,71	8,75		3,365	0,264	22	738

Auf Grund dieser Analysen ergeben sich folgende prozentuale Werte:

Präparat	C %	H %	N %	Fe %
I	63,58	5,07	8,52	8,20
	63,50	5,33	8,49	
II	63,45	5,09	8,70	8,54
	63,28	5,07	8,82	

<sup>1</sup> Die analysierten Präparate waren in der beschriebenen Weise aus kristallisiertem O<sub>2</sub>Hb mit Hilfe von ameisensaurem Äthylalkohol dargestellt worden.

Unter Annahme von  $\text{Fe}^{+++}$  für  $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{O}_6\text{N}_4\text{Fe}$  berechnet.

C %	H %	N %	Fe %
63,53	5,03	8,48	8,45

Diese Untersuchungen wurden nachträglich an denselben Präparaten durch Ameisensäure- und Äthoxyl-Makrobestimmungen ergänzt. Auf Ameisensäure wurde mit Rücksicht auf die Methode der Darstellung untersucht und hierbei, wie von Küster<sup>1</sup> angegeben, vorgegangen. Die Äthoxylbestimmungen wurden deswegen ausgeführt, weil bei entsprechenden Mikrobestimmungen nach vierstündigem Trocknen im Vakuum bei 100° C immer nur geringe und inkonstante Werte von Äthoxyl gefunden worden waren. Es lag so der Verdacht nahe, daß es sich nicht um veresterte Präparate, sondern um solche mit Kristallalkohol handelt. Für diese Auffassung sprach auch die Löslichkeit der Präparate in 5%iger Sodalösung in der Kälte, während sich veresterte Präparate in 5%iger Sodalösung teils erst beim Erhitzen, teils überhaupt nicht lösen<sup>2</sup>. Es wurde zur Klärung dieser Frage ein zuerst mehrere Tage an der Luft, nachher im Schwefelsäureexsikkator getrocknetes Präparat (Nr. 1) im Zeiselschen Apparat einer Makroäthoxylbestimmung unterworfen, und des weiteren gleiche Bestimmungen an demselben und einem anderen Präparat ausgeführt, die durch 24 Stunden hindurch bei 104° C im Glycerintrockenschrank getrocknet worden waren.

Präparat	Substanz g	Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> g	HCOOH %
III	0,1088	0,0386	7,90
	0,1475	0,1195	7,86
	0,1616	0,1107	6,68

Präparat		Substanz g	AgJ g	O C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> %
I	Im Schwefelsäureexsikkator getrocknet	0,0695	0,0198	5,46
	24 Std. bei 104° C getrocknet	0,1200	kein AgJ	kein O C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
III	24 " " 104° C	0,0932	" AgJ	" O C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

Da die Präparate nach Trocknung bei 104° C kein Äthoxyl mehr ergaben und so die Annahme von Kristallalkohol an Wahrscheinlichkeit gewann, wurden zwei Präparate auf ihren Gewichtsverlust bei Trocknung im Glycerintrockenschrank bei 104° C geprüft.

Präparat	Substanz vor dem Trocknen g	Substanz nach dem Trocknen g	Gewichts- verlust %
I	0,1805	0,1572	12,91
III	0,1268	0,1101	13,17

<sup>1</sup> W. Küster u. A. Gerlach, Hoppe-Seylers Zeitschr. 119, 107, 1922.

— <sup>2</sup> W. Küster, ebenda 82, 113, 1912; A. Herzog, diese Zeitschr. 267, 48, 1933.

Wie sich hieraus ergibt, betrug bei den beiden Präparaten der Gewichtsverlust bei der Trocknung im Durchschnitt 13%. Diese Zahl würde für das Vorhandensein von zwei Molekülen Kristallalkohol sprechen. Auf Grund dieser Analysen ergibt sich für die dargestellte Verbindung unter Annahme von  $\text{Fe}^{+++}$  die empirische Formel  $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{O}_6\text{N}_4\text{Fe} \cdot 2 (\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})$ .

### Besprechung der Versuchsergebnisse.

Gegenüber dem erwähnten von *Partos*<sup>1</sup> dargestellten Hämin zeigt die von mir gewonnene Verbindung einige auffallende Unterschiede. Diese zeigen sich teils in der Löslichkeit und Kristallisation, teils auch in dem Analysenergebnis insofern, als das *Partos*sche Hämin, wie *Küster*<sup>2</sup> nachweisen konnte, einen *Monomethylester* darstellt, während ich *meine Substanz* auf Grund meiner Untersuchungen als *unverestert* auffassen muß. Auf das Vorhandensein von Unterschieden weisen außerdem meine spektrophotometrischen Untersuchungen hin, die ich mit meiner Substanz, ebenso wie *Partos*<sup>1</sup>, in verdünnter Natronlauge ausgeführt habe.

Die spektrophotometrischen Untersuchungen habe ich an einem nach *Martens* und *Grünbaum* modifizierten *Königschen* Spektrophotometer vorgenommen, bei dem der Objektivspalt auf 0,1 mm eingestellt und der Okularspalt ein Spektralbereich umfaßte, das im Rot 15  $\mu\mu$  und im Blau 5  $\mu\mu$  betrug. Als Lichtquelle diente eine Metallfadenglühlampe. Die zur Untersuchung hergestellten Lösungen stellte ich durch Lösen von in einem Falle 13,8 mg und im anderen Falle 14,8 mg Substanz (analytierte Präparate) in 0,5%iger Natronlauge her. Die Versuchsergebnisse habe ich in der folgenden Tabelle als spezifische Extinktionskoeffizienten angegeben und die Mittelwerte in der Abb. 2 graphisch dargestellt, wobei ich zu Vergleichszwecken die von *Partos* an seiner Substanz gewonnene Lichtabsorptionskurve eingezeichnet habe.

Wellenlänge <i>m</i>	Spez. Extinktionskoeffizient		Wellenlänge <i>m</i>	Spez. Extinktionskoeffizient	
	Präparat I	Präparat II		Präparat I	Präparat II
636,4	4,45	4,27	579,9	6,11	6,05
625,5	6,29	6,16	569,9	5,94	5,87
610,3	7,29	7,23	556,9	6,13	6,09
605,5	7,30	7,17	537,3	7,85	7,64
594,9	6,70	6,61	521,8	8,31	8,17
587,6	6,36	6,26			

Aus der Abbildung geht die *Verschiedenheit der beiden Substanzen eindeutig hervor*. Während die von mir gewonnene Kurve große Ähnlich-

<sup>1</sup> *S. Partos*, diese Zeitschr. **105**, 49, 1920. — <sup>2</sup> *W. Küster* u. *A. Gerlach*, Hoppe-Seylers Zeitschr. **119**, 98, 1922.

keit mit der Häminkurve aufweist, zeigt sich bei der Kurve von Partos eine deutliche Verschiebung des Absorptionsstreifens gegen Violett.

Das von Partos dargestellte Häm in wurde von Küster<sup>1</sup>, abgesehen von der Veresterung, als Formylhydroxyhäm in aufgefaßt, das man sich nach der Gleichung  $C_{34}H_{32}N_4O_4FeOH + HCOOH = C_{34}H_{32}N_4O_4FeO$   
 $OCH + H_2O$  entstanden denken kann. Nun entspricht zwar sowohl

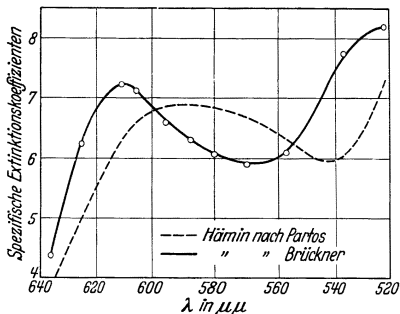


Abb. 2.

bei Partos als auch bei meiner Substanz die prozentuale Zusammensetzung der von Küster vertretenen Formel, doch setzt die formylartige Bindung den fünften Sauerstoff des Hämatins voraus, dessen Vorhandensein nicht ganz erklärlich erscheint. Im Schalfejeffschen Häm in sind vier Sauerstoffe anzunehmen. Der fünfte Sauerstoff tritt in das Häm inmolekül beim Lösen in verdünnten Laugen (Lösung eines Hydroxyds) als Hydroxylgruppe ein. Wenn ich meine Substanz aus Häm in darstelle, so erscheinen plötzlich sechs Sauerstoffe, ohne daß bei der Überführung Lauge verwendet worden wäre, während das Formyl nur einen fünften Sauerstoff erklärlich machen würde. Aus den angeführten Gründen scheint mir daher keine formylartige Bindung, sondern eine salzartige Bindung vorzuliegen, die die aus den Analysen notwendig erscheinende Annahme von sechs Sauerstoffen erklären würde. Es würde daher nicht ein Formylhäm in, sondern ein ameisen-saures Häm in (Häm in-formiat) vorliegen.

#### Zusammenfassung.

In der vorliegenden Mitteilung konnte ich mit Ameisensäure auf kaltem Wege eine kristallinische häminartige, unveresterte Verbindung darstellen und beschreiben, der die empirische Formel  $C_{35}H_{33}O_6N_4Fe \cdot 2(C_2H_5OH)$  zukommt. Ich konnte begründen, daß diese von mir dargestellte Verbindung nicht als Formylhäm in, sondern als ameisen-saures Häm in aufzufassen sei.

Diese Arbeit wurde unter Leitung von Herrn weil. Prof. P. Hári ausgeführt.

<sup>1</sup> W. Küster u. A. Gerlach, Hoppe-Seylers Zeitschr. 119, 98, 1922 und W. Küster u. E. Willig, ebenda 129, 130, 1923.

*Sonderdruck*  
aus „*Biochemische Zeitschrift*“, Bd. 268.  
*Julius Springer, Berlin.*



# Vergleichende Untersuchungen über die Lichtabsorption des Hämato-prosthetins, seiner reduzierten Form, CO-Verbindung und seines Ammoniakhämochromogens.

Von  
Alfred Herzog.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 2. Dezember 1933.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Das Hämochromogen, das früher als die reduzierte eisenhaltige Komponente des Blutfarbstoffs aufgefaßt wurde, ist nun nach *Anson* und *Mirsky* als eine Verbindung der reduzierten, eisenhaltigen Komponente mit einer N-haltigen Base zu betrachten<sup>1</sup>. Über die Lichtabsorption der reduzierten eisenhaltigen Komponente selbst aber ist bisher noch nichts bekannt geworden. Die vorliegende Mitteilung befaßt sich mit den Lichtabsorptionen des *Hämato-prosthetins*<sup>2</sup>, des *CO-Hämato-prosthetins*, des *Hämato-prosthetin-Ammoniakhämochromogens*, und es ist auch gelungen, die des *reduzierten Hämato-prosthetins* festzuhalten.

## Methodik und Beschreibung der Lösungen.

Die zur spektrophotometrischen Untersuchung bestimmten Lösungen wurden, wie folgt, dargestellt:

a) Lösung des *Hämato-prosthetins*: Von den analysierten Präparaten, die bei 100° C im Vakuum getrocknet worden waren, wurden genau gewogene Mengen (6 bis 10 mg) vorsichtig mit einem Glasstab auf einem Uhrgläschen feinst pulverisiert, mit destilliertem Wasser aufgeschwemmt, in einen 50-cem-Meßkolben übertragen, einige Minuten kräftig geschüttelt, 25 Tropfen einer 5%igen Sodalösung zugesetzt und unter wiederholtem Schütteln stengelassen, wobei dann, wenn sich schon der größte Teil gelöst hat und ein Schütteln nicht mehr nötig war, bis zur Marke aufgefüllt wurde. In dieser etwa 0,1 bis 0,15 %igen sodaalkalischen Lösung ging das Hämato-prosthetin bei drei- bis vierstündigem Stehen in Lösung.

b) Lösung des *reduzierten Hämato-prosthetins*: Der, wie unter a) beschrieben, dargestellten Lösung von Hämato-prosthetin wurde in der zur spektrophotometrischen Untersuchung dienenden Küvette ein wenig Natriumhydrosulfit zugesetzt, die Küvette sofort verschlossen und einigemal umgeschwenkt, damit sich das zugesetzte, in Lösung gegangene Reduktionsmittel verteilt. Hierbei tritt ein Farbenumschlag von rot in rotviolett ein. (Bemerkt sei, daß man nicht zuviel Reduktionsmittel zugeben darf, da sonst durch das Auftreten saurer Produkte der Farbstoff zum Ausfallen gebracht wird.)

<sup>1</sup> *Anson* u. *Mirsky*, J. of Physiol. **12**, 273, 1929. — <sup>2</sup> *A. Herzog*, diese Zeitschr. **264**, 415, 1933.

c) Lösung von *CO-Hämato­pro­sthe­tin*: Die, wie unter a) beschrieben, dargestellte Hämato­pro­sthe­tin­lö­sun­g wurde ebenfalls in der zur spektrophotometrischen Untersuchung dienenden Küvette mit Natriumhydro­sulfit reduziert. CO-Gas eingeleitet und die Küvette hierauf sofort verschlossen. (Das CO-Gas gewann ich durch Einführen von konz. Ameisensäure in konz. Schwefelsäure. Es wurde vor Einleiten in die reduzierte Farbstofflösung in einer Waschflasche mit 5%iger NaOH gewaschen.)

d) Lösung von *Hämato­pro­sthe­tin-Ammoniak­hämochromogen*: Pulverisiertes Hämato­pro­sthe­tin wurde in destilliertem Wasser aufgeschwemmt, in einen 50-ccm-Meßkolben übertragen, 10 ccm konz. wässriges Ammoniak und destilliertes Wasser bis zur Marke zugegeben. Der Lösungsprozeß war sehr rasch beendet. Mit dieser Lösung wurde eine Küvette gefüllt, die Lösung dort mit Natriumhydro­sulfit reduziert, die Küvette verschlossen und untersucht. [Im Gegensatz zu den Lösungen unter a) bis c), die klar waren, konnte ich hier nach Reduktion das Ausfallen kleinster Partikelchen in allerdings geringer Menge auch bei noch so vorsichtigem Zusatz von Reduktionsmitteln nicht vermeiden. Ich glaube aber, diesen Fehler vernachlässigen zu dürfen, da die Untersuchungen in geringer Schichtdicke ausgeführt, die ausgefallenen Partikelchen auf die Gefäßwand sedimentiert waren und es bei meinen Untersuchungen vorwiegend auf die qualitativen Unterschiede in der Lichtabsorption der einzelnen Formen von Hämato­pro­sthe­tin ankam.]

Die *Hämato­pro­sthe­tin*­lö­sun­g war dunkelrot gefärbt und zeigte spektroskopisch den üblichen Häminstreifen im Rot und die zunehmende Absorption im Blau. Die Lösung *reduzierten Hämato­pro­sthe­tins* zeigte rotviolette Farbe und im Spektroskop *einen* Streifen, der sich vom Gelb ins Grün erstreckt und bei dünner Schicht oder geringer Konzentration in der Mitte eine geringe Aufhellung aufweist. Die *CO-Hämato­pro­sthe­tin*­lö­sun­g ähnelte in der Farbe dem COHb und ergab bei spektroskopischer Untersuchung wie letzteres ebenfalls zwei Streifen, doch erschien hier die Absorption beider Streifen nicht gleich, sondern die des rotwärts gelegenen  $\alpha$ -Streifens deutlich stärker als die des blauwärts gelegenen  $\beta$ -Streifens. Die *Hämato­pro­sthe­tin-Ammoniak­hämochromogen*­lö­sun­g wies die bei Hämochromogenen übliche Farbe und spektroskopisch auch das für diese Verbindungen charakteristische Spektrum auf.

Die spektrophotometrischen Untersuchungen führte ich an einem nach *Martens* und *Grünbaum* modifizierten *Königschen* Spektrophotometer aus, wobei der Objektivspalt auf 0,1 mm Breite eingestellt war und der Okularspalt jeweils ein Spektralbereich umfaßte, dessen Breite im Rot etwa 15 m $\mu$ , im Blau 5 m $\mu$  betrug. Als Lichtquelle diente eine Metallfadenglühlampe.

Da die Lösungen von reduziertem Hämato­pro­sthe­tin, CO-Hämato­pro­sthe­tin und Hämato­pro­sthe­tin-Ammoniak­hämochromogen starke Absorptionen aufweisen, war es notwendig, bei den Untersuchungen die Schichtdicke zu wechseln. Da nun die genannten Lösungen *an der Luft nicht haltbar* waren und sich *rasch oxydierten*, mußte ich aus einer Hämato­pro­sthe­tin­lö­sun­g jeweils beim Wechseln der Schichtdicke die betreffende

Tabelle I.

Hämatoprosthetin			Reduziertes Hämatoprosthetin			CO-Hämatoprosthetin			Hämatoprosthetin-NH <sub>2</sub> -Hämochromogen		
Mitte des Spektral-ausschnittes in m $\mu$	Lösung I	Lösung II	Mitte des Spektral-ausschnittes in m $\mu$	Lösung I	Lösung II	Mitte des Spektral-ausschnittes in m $\mu$	Lösung I	Lösung II	Mitte des Spektral-ausschnittes in m $\mu$	Lösung I	Lösung II
650	2,69	2,87	650	2,42	2,63	650	2,26	2,10	650	4,52	5,26
635	5,17	5,18	625	3,72	4,03	625	3,48	3,64	625	5,48	6,54
620	7,39	7,28	610	5,14	5,41	600	3,65	4,43	600	6,71	8,10
614	7,73	7,74	600	6,68	6,90	590	5,04	6,23	590	7,59	9,03
612	7,59	7,80	590	8,56	8,60	580	8,95	8,54*	580	9,18	9,93
610	7,68	7,80	583	9,21*	9,79*	575	13,05*	12,51	575	10,64	10,82
608	7,75	7,78	583	9,69	10,32	570	18,45	17,92	570	12,20	11,83
606	7,75	7,68	580	10,17	10,56	568	20,42	21,32*	565	15,92	15,16
604	7,63	7,58	576	10,80	10,64	566	22,18	23,47	563	19,67*	20,95*
600	7,43	7,40	573	11,21	10,64	564	23,75	25,01	558	24,98	23,55
590	6,94	6,90	570	10,73	10,56	562,8	24,09	25,62	556	26,60	30,07
580	6,72	6,69	566	10,34	10,36	559	24,45	25,38	554	33,92	31,01
575	6,60	6,45	563	10,96	10,42	555	23,91	25,31	552	36,06	32,53
571	6,60	6,38	560,8	10,84	10,37	555	21,55	23,69	552	36,04	32,53
569	6,65	6,37	555	10,75	9,84*	552	20,22	21,37	550	34,61	30,75
567	6,66	6,34	550	10,59	9,40	549	19,09	19,45	545	25,38	24,75
565	6,72	6,34	545	10,45	9,36	545	17,67	18,13	540	20,54	20,66
563	6,61	6,43	540	10,21	8,95	543	17,57	18,42	537,4	19,42	20,08
560,8	6,55	6,48	537,4	10,01	8,92	541	17,67	17,88	536	19,76	19,88
555	6,58	6,72	530	9,22	8,25	535	17,83	19,14	532	20,07	19,55
545	7,37	7,35	525	9,01	8,03	532	18,64	19,66	530	20,20	20,23
537,4	8,10*	8,23*	520	8,46	7,06	530	19,67	20,48	527	20,95	20,43
525	9,20	9,27	510	8,46	7,71	528	19,89	19,86	525	21,91	21,36
510	10,10	9,76				525	19,04	19,43	523	22,49	21,77
						520	16,99	17,27	521	22,96	21,40
						510	12,03	12,04	519	22,08	21,04
									515	18,53	18,83
									510	17,94	16,92

\* An diesen Stellen wurde die Schichtdicke gewechselt.

Farbstoffform frisch herstellen. Hierin ist auch der Grund dafür zu erblicken, daß die Werte der Parallellösungen beim Hämato-prosthetin viel besser übereinstimmen als bei den anderen untersuchten Lösungen, zu deren Darstellung reduziert werden mußte. Die Unterschiede liegen aber in brauchbaren Grenzen.

#### Versuchsergebnisse.

Die auf spezifische Extinktionskoeffizienten umgerechneten Versuchsergebnisse je zweier Lösungen der einzelnen Versuchsgattungen habe ich in der Tabelle wiedergegeben und zwecks eindrucksvollerer Vergleichsmöglichkeit deren Mittelwerte in ein Ordinatensystem eingetragen und so die Lichtabsorptionen der untersuchten Hämato-prosthetinmodifikationen zur graphischen Darstellung gebracht.

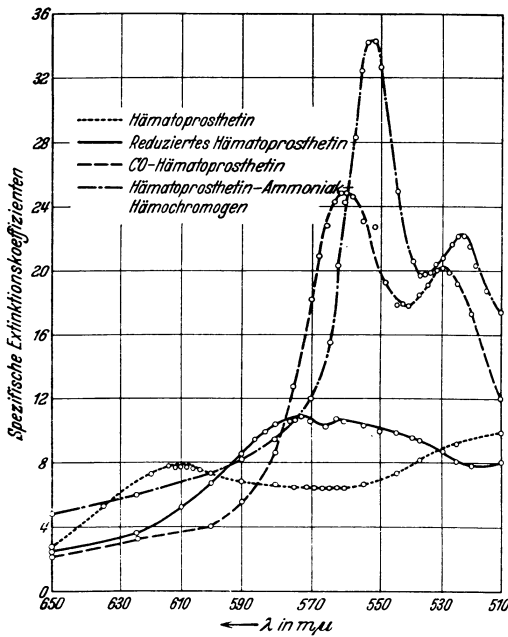


Abb. 1.

Wie aus den Untersuchungen hervorgeht, zeigt das Hämato-prosthetin ein ähnliches Spektrum wie die alkalischen Häm-in-lösungen, und zwar ein Maximum bei etwa 608 mμ und ein „Minimum“ bei etwa 566 mμ. Das reduzierte Hämato-prosthetin besitzt einen Absorptionsstreifen, der gegenüber jenem des Hämato-prosthetins nach Violett verschoben und an seiner höchsten Erhebung in Übereinstimmung mit seiner spektroskopischen Erscheinung deutlich zwei durch ein flaches „Minimum“ getrennte Gipfel zeigt. Die beiden Erhebungen liegen bei 573 und 562 mμ, wobei die rotwärts gelegene in geringem Grade höhere Werte zeigt, und

die Einsenkung bei 566  $m\mu$ . Die Kurve des *CO-Hämatoprosthetins* zeigt je ein Maximum bei 560 und 530  $m\mu$ , und ein „Minimum“ bei 543  $m\mu$ . Am COHb wurden am gleichen Apparat die Maxima bei 566 und 537  $m\mu$  und das „Minimum“ bei 551  $m\mu$  gefunden<sup>1</sup>. Außer der geringeren Absorption des  $\beta$ -Streifens gegenüber dem  $\alpha$ -Streifen ergibt sich demnach auch in der Lage der Streifen gegenüber dem COHb ein Unterschied insofern, als die Streifen des CO-Hämatoprosthetins gegenüber letzterem um etwa 6  $m\mu$  violettwärts verschoben sind. Dieser Befund entspricht auch den anderen Modifikationen der prosthetischen Gruppe, die wie Hämatoprosthetin in alkalischer Lösung und reduziertes Hämatoprosthetin gegenüber den diesen entsprechenden Modifikationen des Hämoglobins in ihrer Lichtabsorption ebenfalls abweichen. Die Maxima des *Hämatoprosthetin-Ammoniakhämochromogens* liegen bei 553 und 524  $m\mu$  und das „Minimum“ bei 536  $m\mu$ . Am von Häm in ausgehenden Ammoniakhämochromogen fand *A. Dénes* bei Versuchen, deren Veröffentlichung folgt, die gleiche Lage der Maxima und des „Minimums“.

#### Zusammenfassung.

1. Die Lichtabsorptionen des Hämatoprosthetins und des Hämatoprosthetin-Ammoniakhämochromogens entsprechen in ihrem Verlauf den analogen Modifikationen des Hämins.
2. Das reduzierte Hämatoprosthetin besitzt nur einen Lichtabsorptionsstreifen, der in der Gegend seiner höchsten Erhebung zwei flache Gipfel aufweist.
3. Die Lichtabsorption des CO-Hämatoprosthetins weicht von der des COHb in bezug auf Lage und Verlauf der Kurve ab.

---

<sup>1</sup> *V. Sebesta* bzw. *V. Sebesta* u. *A. Herzog*, diese Zeitschr. **260**, 187, 1933; **267**, 157, 1933.

*Sonderdruck*  
aus „*Biochemische Zeitschrift*“, Bd. 270.  
*Julius Springer, Berlin.*

# Über eine empfindliche und spezifische Reaktion des Ergosterins.

Von  
Josef Brückner.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der kgl. ung. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 22. März 1934.)

Auf Vorschlag von Z. Aszódi befaßte ich mich mit Studien über die Bestimmbarkeit des Bestrahlungseffektes und des Grades der Umwandlung des Ergosterins, mit besonderer Berücksichtigung des Vitamins D auf der Grundlage der bekannten Ergosterinreaktionen. Bei diesen Untersuchungen gelangte ich zu Ergebnissen, die mir die Ausarbeitung einer sehr empfindlichen Reaktion für Ergosterin erlaubten, die mit Vitamin D in anderer, aber ebenfalls *charakteristischer Weise verläuft*.

Den Untersuchungen liegt der von Meesemaeker beschriebene Befund zugrunde, wonach Ergosterin mit wasserfreiem Zinkchlorid und Essigsäureanhydrid eine anfangs rosa, dann über Blau ins Grüne übergehende Färbung gibt<sup>1</sup>, wobei aber das Reaktionsgemisch kein charakteristisches Spektrum aufweist. Hierbei geben Öle (Ölsäure) und Cholesterin eine braune Farbe, was sich bei der Ausführung der Reaktion störend bemerkbar machen kann. Mit Hilfe von Aceton und einigen Metallsalzen gelang es mir aber, diese Reaktion weitaus *empfindlicher und spezifischer zu gestalten*, so daß sie für *Untersuchungen in verschiedenem, auch öl- oder cholesterinhaltigem Milieu geeignet wurde*.

## Ausführung der Reaktion.

*Natives* (unbestrahtes) Ergosterin wird in 2 ccm Benzol oder Chloroform gelöst, nach Zugabe von 1 ccm Essigsäureanhydrid und  $\frac{1}{2}$  ccm Aceton einige Körnchen eines Kupfersalzes — ich verwendete Cupriacetat wegen der besseren Löslichkeit gegenüber anorganischen Kupfersalzen — und nachher  $\frac{1}{2}$  oder 1 g wasserfreies Zinkchlorid zugesetzt. Es entsteht eine prachtvolle *blauviolette Farbe mit starker roter Fluoreszenz* die einen bis zwei Tage anhält<sup>2</sup>. Die Reaktion war noch deutlich positiv,

<sup>1</sup> R. Meesemaeker, J. Pharmacie 8, 11, 380, 1930. — <sup>2</sup> Zwecks einfacherer Durchführung mehrerer Untersuchungen empfehle ich, folgendermaßen vorzugehen: Reagens I besteht aus Aceton und Essigsäureanhydrid im Verhältnis 2:3 und 5 bis 10 % Kupfersalz, das aufgelöst wurde. Reagens II stellt eine halbgesättigte Lösung von wasserfreiem  $ZnCl_2$  in Essigsäureanhydrid dar. (Bei höherer  $ZnCl_2$ -Konzentration tritt eine unangenehme Braunfärbung des Reagens ein.) Ausführung: 3 ccm

wenn 1 ccm Benzol 0,0006 mg Ergosterin bzw. 0,1 ccm Benzol 0,0001 mg Ergosterin enthielt. (Einige Milligramm getrockneter Hefe in Substanz in das Reagensgemisch eingetragen, geben eine stark positive Reaktion.) Das Reaktionsgemisch zeigte bei spektroskopischer Untersuchung einen starken und charakteristischen *Absorptionsstreifen im Orangerot*, dessen Maximum bei spektrophotometrischer Untersuchung bei 612  $\mu$  gefunden wurde.

Die Untersuchung des entstandenen farbigen Reaktionsproduktes im Ultramikroskop läßt an ein Kolloid denken, für welche Auffassung auch die starke rote Fluoreszenz spricht. Vielleicht handelt es sich um ein Kupferoxyd oder eine komplexe Kupfer-Zink-Ergosterinverbindung in kolloidaler Dispersion.

Die Reaktion war mit Ölsäure, reinen Ölen und Cholesterin negativ (kein Farbeffekt). Tafelöl gab bei Ausführung der Reaktion eine intensive grüne Farbe ohne Fluoreszenz (vielleicht wegen des Phytosterin- und Carotinoide (Carotin bzw. Zeaxanthin) hingegen eine schwache Blaufärbung, die sich aber im Farbenton und auch Fehlen des Lichtabsorptionsstreifens von einer positiven Ergosterinreaktion unterscheidet.

*Vitamin D<sub>2</sub>* gibt bei gleichem Vorgehen, wie bei Ergosterin beschrieben wurde, eine gelbliche, in einigen Minuten ins *Rotbraune* übergehende Farbe. In dem braunen Reaktionsgemisch zeigt sich ein *Lichtabsorptionsstreifen*, der sich vom *Grün ins Blau* erstreckt.

*Calciferol* gibt dieselbe Farbenreaktion als Vitamin D<sub>2</sub> mit dem gleichen Spektrum, was für die *Identität der beiden Präparate* spricht.

*Bestrahltes Ergosterin* zeigt die für Ergosterin charakteristische Blaufärbung und Absorptionsstreifen, aber außer letzteren auch jene des Vitamins D. *Vigantol* ergibt eine Reaktion, die dem Vitamin D ähnelt (Rotbraunfärbung und Absorptionsstreifen), später aber in eine Blaufärbung übergeht, in der aber der Vitamin D-Streifen noch sichtbar ist. Bei *Radiostol* fand ich die typische Reaktion, die ich bei bestrahltem Ergosterin beobachten konnte.

Ohne Kupfersalze verläuft die bei Ergosterin beschriebene Reaktion ebenfalls positiv, zeigt auch dasselbe Spektrum, doch konnte ich eine bedeutend geringere Empfindlichkeit beobachten. Desgleichen schien mir die Empfindlichkeit auch von der Zugabe von Essigsäureanhydrid abhängig zu sein, wohl wegen seiner wasserentziehenden Wirkung. Beim Schütteln mit Wasser verschwindet die Reaktionsfarbe. Außer

---

benzolischer Ergosterinlösung oder auf Ergosterin zu untersuchender Extrakt werden mit  $\frac{1}{2}$  ccm von Reagens I und 1 ccm von Reagens II versetzt und 2 bis 3 Minuten in einem Wasserbad von 70° C gehalten, wobei die beschriebene Farbenreaktion eintritt. (Das zur Reaktion dienende wasserfreie ZnCl<sub>2</sub> wurde in einer weithalsigen Flasche mit eingeschlifffenem Stopfen unter Benzol aufbewahrt und bei Verwendung mit einem Nickellöffel entnommen.)



Kupfersalzen habe ich auch Salze verschiedener anderer Metalle in bezug auf ihr Verhalten bei der beschriebenen Reaktion untersucht. Hierbei fand ich Silber- und Goldsalze (entsprechend ihrer Stellung im periodischen System) von ähnlicher Wirkung wie Kupfersalze, die Salze anderer Metalle (Fe, Mn, Ni, Ca, Cr, Ur, Hg) aber wirkungslos. Bei *Untersuchung auf Vitamin D* möchte ich die *Verwendung von Silber-salzen* empfehlen, da diese mit letzterem spezifischer reagieren als mit Ergosterin. Goldchlorid gibt mit einer benzolischen Ergosterinlösung nach Zugabe einiger Tropfen Essigsäureanhydrid eine purpurrote Färbung, die rasch in Violett umschlägt und ungefähr eine Stunde beständig ist. Mit Aceton scheint die Reaktion noch empfindlicher zu sein und der Farbumschlag in Violett sich rascher zu vollziehen. Die Reaktion weist auf die Entstehung eines Goldsols hin.

#### **Zusammenfassung.**

Es wurde eine empfindliche und spezifische Reaktion beschrieben, die mit Ergosterin eine blauviolette Färbung, mit Vitamin D eine rotbraune Farbe ergibt, wobei auch die Reaktionsgemische charakteristische Lichtabsorptionsstreifen aufweisen. Die Reaktion gestattet den Nachweis von Vitamin D in bestrahlten Ergosterinpräparaten.

Für die freundliche Zusendung von Vitamin D<sub>2</sub> sei Herrn Prof. *Windaus*, für die von Calciferol Herrn Prof. *R. K. Callow*, für die von Carotin und Zeaxanthin Herrn Prof. *L. Zechmeister* an dieser Stelle herzlichst gedankt.

## Tierische Kalorimetrie.

IX. Mitteilung:

### Über die spezifisch-dynamische Wirkung von Eiweiß.

Von

Zoltán Aszódi und Josef Pélyi.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der kgl. ung. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 18. März 1934.)

Es kann als allgemein anerkannt gelten, daß von den Nahrungsmitteln der Zuwachs der Wärmeproduktion bei den Eiweißstoffen am größten ist. Bezüglich des Zuwachses der Wärmeproduktion nach Verabreichung von Kohlenhydraten und Fetten aber sind in der Literatur widersprechende Auffassungen geäußert worden. Ein Teil der Autoren spricht den Kohlenhydraten eine größere spezifisch-dynamische Wirkung zu, ein anderer Teil der Autoren wieder den Fetten. Dies geht aus folgender Zusammenstellung hervor, in der die wichtigsten Versuchsergebnisse der Literatur bezüglich der spezifisch-dynamischen Wirkung tabellarisch angeführt sind.

Wie die Tabelle I zeigt, ist tatsächlich der Zuwachs der Wärmeproduktion nach Verabreichung von Eiweiß am größten, und es beträgt die Erhöhung des Grundumsatzes im Durchschnitt — wenn man von extrem großen Mengen von verabreichtem Eiweiß absieht — 30 bis 40 %. Bei den Kohlenhydraten aber finden wir zwar ebenfalls immer eine Steigerung der Wärmeproduktion, doch zeigen im Gegensatz zum Eiweiß die Angaben eine viel größere Schwankungsbreite. Bei den mit Fetten ausgeführten Versuchen finden sich wieder solche, die sogar auf eine Verminderung der Wärmeproduktion schließen lassen.

Die Auffassungen über die Entstehung der *spezifisch-dynamischen Wirkung* sind bisher noch geteilt. Nach *Rubner* (23) kann man in ihr ein Maß für eine spezifische Energieart erblicken, die nach der Nahrungszufuhr auftritt. *Lusk* (24) führt sie auf eine stimulierende Wirkung der Aminosäuren auf die Körperzellen zurück. *F. Müller* (25) bringt sie mit jener Wärmemenge in Zusammenhang, die bei der Überführung von Eiweiß in Kohlenhydrate im Laufe der intermediären Stoffwechselvorgänge frei wird.

Die spez.-dyn. Wirkung der N-freien Substanzen faßt *Rubner* (26) in der gleichen Weise auf, wie die bei Verabreichung von Eiweißstoffen, nur in der Wirkung kleiner. Nach *Lusk* (27) wird die Wärmeproduktion nach Verabreichung von Fetten durch die Vermehrung von Fettstoffwechselprodukten verursacht, welche Erscheinung er als Fettplethora bezeichnet. Auch die Wirkung der Kohlenhydrate erklärt der genannte Forscher mit einer Plethora der Glykoseiteichen während der Zeit des größten Stoffwechsels. Diese Theorie wurde nach neueren Arbeiten dieser Schule in der

Tabelle I.

Autor	Eiweiß	Kohlenhydrate	Fette
<i>Magnus-Lévy</i> (1)	Je größer die verabreichte Eiweißmenge, desto größer die Wirkung 30—90% 16,7% 30,9%	Etwa 20% — 5,8%	140 g Speck 10% 340 g Speck 19%
<i>Koraen</i> (2)	—	—	—
<i>Rubner</i> (3)	—	—	12,7%
<i>Schreuer</i> (4)	Die Steigerung ist gewaltig	Bei Kohlenhydraten spez.-dyn. Wirkung als bei Fetten	größere
<i>Heilner</i> (5)	—	Nach Glykose 4%	—
<i>Gigon</i> (6)	Casein: 50—250 g 6—54%	—	Nach 50 g Öl verminderte Wärme- produktion
<i>Williams, Rich und Lusk</i> (7)	Nach 700 g Fleisch 45% nach 1200 g Fleisch 82%	—	—
<i>Lusk</i> (8)	—	Bei 20—103 g Glykose 15—20%	—
<i>Aub und Du Bois</i> (9)	46%	—	—
<i>Nakayama</i> (10)	300 g Fleisch	70 g Zucker 27,8%	—
<i>Lusk</i> (11)	—	Nach Fructose 37% " Saccharose 34% " Glykose 30% " Galaktose 22%	—
<i>Murlin und Lusk</i> (12)	—	—	Etwa 30%
<i>Benedict und Carpenter</i> (13)	25—45%	25%	12%
<i>Weiß und Rapport</i> (14)	200—1200 g Fleisch 30—80%	—	—
<i>Rapport</i> (15)	Verschiedene Eiweißstoffe in einer Menge 6 g Stickstoff entsprechend: 29—35%	—	—
<i>Boyd, Hines und Leese</i> (16)	—	Nach intravenöser Verabreichung von pro kg Körper- gewicht 4 g Glykose: 50%	—
<i>Hári</i> (17)	300 g Fleisch 24,7% 200 g " 9,4%	—	—
<i>Baur</i> (18)	—	Nach 85 g Glykose 26%	—
<i>Dann und Chambers</i> (19)	—	12—33%	—
<i>Meyer</i> (20)	Nach 500 g Fleisch 20%	—	—
<i>Wierzuchowski</i> (21)	—	Nach Glykose 9,7% " Lävulose 19,8% " Galaktose 7,3%	—
<i>Carpenter und Fox</i> (22)	—	5—36 g 4—6% 52 g 10%	—

Weise geändert, daß die spez.-dyn. Wirkung auf die sich zwischen Glykose und Glykogen abspielenden intermediären Stoffwechselvorgänge zurückgeführt wird.

Da die Anschauungen über die quantitativen Verhältnisse der spez.-dyn. Wirkung verschiedener Nahrungsstoffe und auch die Auffassungen über die Erklärungsweise des Entstehens der spez.-dyn. Wirkung verschieden sind, und da weiterhin unsere Vorversuche die Annahme rechtfertigten, daß unser neuer Apparat, der Jahre hindurch vervollkommenet worden war, zur Lösung der oben genannten Probleme Anhaltspunkte zu liefern vermag, entschlossen wir uns, die nach der Nahrungsaufnahme eintretende Wärmebildung und einsetzenden Stoffwechselvorgänge in kurz nacheinander folgenden Perioden zu untersuchen. Um einen möglichst genauen Einblick in die Stoffwechselvorgänge zu erlangen, konnten wir uns nicht mit der Bestimmung einzelner Faktoren begnügen, sondern mußten trachten, Wärmebildung, Sauerstoffverbrauch, Kohlensäure- und Wasserabgabe gleichzeitig zu bestimmen. Hierbei konnten wir die direkte Kalorimetrie indirekt durch den Sauerstoffverbrauch kontrollieren und die Richtigkeit des letzteren durch die von *Haldane* angegebene Berechnungsweise prüfen. *Durch dieses Vorgehen konnte eine größtmögliche Sicherheit und demnach auch Beweiskraft unseres Ziffernmateriäls erreicht werden.* Bezüglich der Berechnung der spez.-dyn. Wirkung kann man, wie *Hári* (17) auseinandersetzt, verschieden vorgehen. Man kann die Steigerung der Wärmeproduktion a) auf die Hungerwerte (Grundumsatz), b) auf die gesamte mit der Nahrung eingeführte chemische Energie, c) bei reiner Eiweißfütterung auf deren physiologischen Nutzeffekt, d) auf den Energiegehalt des während des Versuches im Organismus tatsächlich verbrannten Eiweißes und e) nach *Lusk* auf das gesamte im Fütterungsversuch verbrannte Eiweiß unter Abzug jener Eiweißmenge beziehen, die auch sonst ohne Eiweißzufuhr verbrannt worden wäre. Wenn auch *Hári* bei den angeführten verschiedenen Berechnungsarten zu divergierenden Zahlen gelangt, so verhielten sich diese doch bei jeder dieser Berechnungsarten immer proportional zur verabreichten Eiweißmenge.

In unseren Versuchen haben wir die Berechnung unter Beziehung auf den Grundumsatz deswegen vorgenommen, weil wir im Rahmen eines Versuchs ohne Unterbrechung den Grundumsatzwert und die Fütterungswerte gewonnen haben. *Als Ausdruck der spez.-dyn. Wirkung haben wir demnach den Mittelwert der Wärmesteigerung aus sämtlichen Fütterungsperioden unter Beziehung auf die Normalperioden angegeben.*

### Experimenteller Teil.

#### a) Apparatur und Versuchsanordnung.

Die Versuche wurden an dem neuen von *Hári* (28) nach dem *Tangl*-schen Prinzip konstruierten und auch bereits veröffentlichten Kompensationskalorimeter ausgeführt. Dieses Kalorimeter stellt ein Respirationkalorimeter dar, das den Sauerstoffverbrauch des Tieres direkt zu messen und auch die Kohlensäure- und Wasserabgabe festzustellen erlaubt. Die so ermittelten Werte dienen teils zur Berechnung des respiratorischen Quotienten, teils zur Berechnung der Wärmeproduktion. (Die Genauigkeit des Apparates war vor Beginn dieser Untersuchungen durch Alkoholversuche sichergestellt worden.) Das jeweils knapp vor Beginn und sogleich

nach der Beendigung des Versuches auf einer *Sauterschen Waage*, die mit einer Genauigkeit von 5 cg arbeitet, ermittelte Gewicht des Tieres und die ebenfalls pünktlich gewogene Harnmenge, die unter *Paraffinöl* aufgefangen worden war, gestatteten uns zusammen mit der bekannten Menge zugeführter Nahrungsmittel die Berechnung des Sauerstoffverbrauches (indirekter  $O_2$ ), welcher Wert uns dann als Kontrolle gegenüber den verbrauchten und direkt gemessenen Sauerstoff in unseren Zusammenstellungen diente.

Die durch *Strahlung* abgegebene Wärmemenge wurde mit Hilfe des Kompensationsprinzips gemessen. Die durch *Leitung* abgegebene Wärmemenge konnte aus der Ventilationsgeschwindigkeit und der mittleren Temperaturdifferenz zwischen eintretender und austretender Luft mit Hilfe der bekannten physikalischen Daten (spez. Gewicht, spez. Wärme) ermittelt werden. Die *Wärmemenge durch Wasserabgabe* wurde aus der während des Versuchs abgegebenen Wassermenge und deren Verdampfungswärme berechnet (0,582 Cal pro g Wasser). Aus den so erhaltenen Werten konnte die Wärmeproduktion unter Berücksichtigung des Tiergewichtes und der Änderungen der Körpertemperatur des Tieres nach der von *Hári* (29) angegebenen Formel festgestellt werden. Als Versuchstiere dienten drei Hündinnen, an denen schon mehrere Wochen vorher zwecks Sichtbarmachung der Harnröhrenmündung zur Ermöglichung der Katheterisierung eine Perineotomie ausgeführt worden war. Diese Versuchstiere waren — außer zu den Versuchszeiten — zusammen in einem größeren Käfig untergebracht, so daß sie sich ungehindert frei bewegen konnten. Sie erhielten als Futter gemischte Abfallkost. Nach 36- bis 72stündigem Hungern wurde zu Beginn des Versuchs die Temperatur gemessen, die Tiere nach Entleeren der Blase abgewogen und hierauf sofort in den Kalorimeterraum gebracht. Die Versuche dauerten 18 bis 22 Stunden, von denen die ersten 4 Stunden als Vorperiode betrachtet wurden, um dem Tiere die Möglichkeit zu geben, sich an die neue Umgebungstemperatur (kritische Temperatur) zu gewöhnen. Nachdem sich so in dieser Zeit die anfängliche Unruhe des Tieres gelegt hatte, erfolgte in zwei zweistündigen Perioden die Bestimmung des Grundumsatzes, und die übrige Zeit stand dann der Untersuchung über die spez.-dyn. Wirkung der verabreichten Nahrungsstoffe zur Verfügung. *Diese Versuchsdurchführung gestattete das Studium der spez.-dyn. Wirkung der Nahrungsstoffe im Rahmen nur eines, ohne Unterbrechung ausgeführten Versuches.*

Die zu dem betreffenden Versuch dienende Nahrung wurde genau gewogen in die Fütterungsvorrichtung des Kalorimeters gebracht und dann nach Bestimmung des Grundumsatzes dem Tiere mit Hilfe der von *Hári* beschriebenen Fütterungsvorrichtung gereicht, so daß hierbei der Versuch nicht unterbrochen werden brauchte. Nach der Darreichung der Nahrung wurde der Versuch in zweistündigen Perioden solange fortgesetzt, bis wir annehmen konnten, daß die Wirkung im Abklingen begriffen war. Nach Beendigung des Versuchs wurde das Tier abermals genau gewogen, die Blase entleert und die Temperatur des Tieres gemessen. Außer der Wärmeabgabe wurde auch der Sauerstoffverbrauch, die Wasser- und Kohlensäureabgabe in zweistündigen Perioden festgestellt, zu welchem Zwecke uns zwei Absorptionssysteme zur Verfügung standen, die wir zu den einzelnen Perioden abwechselnd in Gebrauch setzten. Die absorbierte Kohlensäure (Natronkalk) und das Wasser (konz. Schwefelsäure) wurden dann in der Zwischenzeit bestimmt. Die Sauerstoffzufuhr erfolgte in ebenfalls zwei-

stündigen Perioden abwechselnd aus zwei kleinen, 5 kg schweren Sauerstoffbomben. (Der Stickstoffgehalt der Bombe wurde hierbei immer festgestellt und bei unseren Berechnungen berücksichtigt.) Am Ende jeder Periode wurde aus der im Ventilationssystem kreisenden Luft eine Gasprobe entnommen und diese im *Haldameschen* Apparat analysiert. Das Analyseergebnis diente zur Korrektur des Sauerstoffverbrauches und der Kohlen säureabgabe. Der im Absorptionssystem aufgefangenen Wassermenge mußte am Ende jeder Periode der Feuchtigkeitsgehalt der Luft im Kalorimeter zugerechnet werden, den wir in der Weise feststellten, daß wir den relativen Feuchtigkeitsgrad des Kalorimeterraumes bestimmten und die Wassermenge der Luft aus diesem Werte und dem Luftvolumen des Kalorimeters berechneten. Als Temperatur des Tierraumes wurde das Mittel der Temperatur des eintretenden und austretenden Luftstromes betrachtet, und wenn auch dieser Mittelwert manchmal 1 bis 2° C unter der kritischen Temperatur lag, so können wir diese kleine unvermeidbare Ungenauigkeit übergehen, da die Temperatur des austretenden Luftstromes die kritische Temperatur immer überschritt. Im Tierraum hatten wir ein Maximumthermometer an einer Stelle in der Weise angebracht, daß es vom Tier und auch seiner Atemluft nicht direkt berührt werden konnte. Wenn dieses Thermometer über 28° C anzeigte, so wurde der Versuch gestrichen. An den verwendeten Versuchstieren haben wir mit Hilfe einiger Vorversuche mit je vier bis fünf zweistündigen Perioden den Ruhestoffwechsel und jene Temperatur der Ventilationsluft bestimmt, bei der der Ruhestoffwechsel am kleinsten war (kritische Temperatur). Von der Mitteilung der Daten dieser orientierenden Versuche haben wir abgesehen. Die Versuchstiere wurden nur dann zu den Hauptversuchen herangezogen, wenn sie sich in den Vorversuchen an die Versuchsmethodik gewöhnt und bei den Versuchen ruhig verhalten hatten. (Von zwölf verfügbaren Hündinnen hatten wir zu den Hauptversuchen jene drei ausgewählt, die in den Vorversuchen das ruhigste Verhalten gezeigt hatten.) Im Kalorimeter verhielten sich diese drei ausgewählten Hündinnen bei den Hauptversuchen, abgesehen von der ersten Viertelstunde, durchaus ruhig. Nur bei der Darreichung der Nahrung führten die Versuchstiere größere Bewegungen aus.

Versuchstier Nr. 1 war ein älteres Tier, das zu vier Versuchen diente und dabei immer geringere Mengen von Pferdefleisch erhielt. Versuchstier Nr. 2, ebenfalls ein älteres Tier, von etwa demselben Gewicht wie Versuchstier Nr. 1, wurde zu acht Versuchen benutzt, wobei es bei vier Versuchen immer geringere Mengen von Pferdefleisch, in den übrigen vier Versuchen immer geringere Mengen von gekochtem Eiklar erhielt. Versuchstier Nr. 7 war ein jüngeres Tier von etwa gleichem Gewicht wie die beiden anderen. Es wurde ihm in vier Versuchen eine immer geringere Menge von gekochtem Eiklar verabreicht.

Die einzelnen Bewegungen des Tieres konnten mit Hilfe einer *Mareyschen* Trommel auf ein Kymographion übertragen werden, da der Tierkäfig des Kalorimeters durch eine besondere Vorrichtung (28) aufgehängt war. Die auf dem Kymographion verzeichneten Bewegungen wurden nach dem Versuch ausgezählt und je nach der Zahl der registrierten Bewegungen das Verhalten der Versuchstiere in der Weise klassifiziert, wie es in der Fußnote der Generaltabelle angegeben ist.

## Generaltabelle

Versuch	Tier	Gewicht des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Temperatur des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Mittlere Temperatur des Tierbehälters	Datum	Sauerstoffverbrauch	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	RQ			
Nr.	Nr.	g	°C	°C		g	g	g				
28	2	9378,3 9590,0	38,4 38,2	24,6 25,0 25,2 25,6 26,5 26,5	2. X. 1931	16,48 7,76 8,13 10,92 11,64 10,93	16,97 7,44 8,57 11,79 13,58 11,24	16,35 6,52 7,93 11,49 16,97 15,55	0,736 0,696 0,767 0,785 0,849 0,748			
					8 <sup>h</sup> —12 <sup>h</sup>							
					12—14							
					14—16							
					16—18							
					18—20							
					20—22							
					Zusammen: bestimmt					65,86		
					berechnet					67,00		
					29					1	9566,7 9688,2	37,4 38,4
7 <sup>h</sup> 50'—11 <sup>h</sup> 50'												
11 50—13 50												
13 50—15 50												
15 50—17 50												
17 50—19 50												
19 50—21 50												
21 50—23 50												
23 50—1 50												
Zusammen: bestimmt	101,60											
berechnet	101,93											
30	2	9057,7 9065,3	38,1 38,2	24,7 25,1 25,3 25,4 26,3 26,1 25,8 25,9	9. X. 1931	18,55 8,48 8,48 10,05 9,56 8,76 9,21 10,62	19,13 8,17 8,57 10,10 10,75 10,31 8,81 9,77	24,27 8,18 7,46 8,99 12,20 14,78 13,45 14,50	0,750 0,701 0,735 0,731 0,818 0,850 0,696 0,669			
					8 <sup>h</sup> —12 <sup>h</sup>							
					12—14							
					14—16							
					16—18							
					18—20							
					20—22							
					22—24							
					24—2							
					Zusammen: bestimmt					83,72		
berechnet	82,99											
31	1	9502,1 9566,7	38,2 38,5	25,5 26,0 26,2 27,0 27,1	11. X. 1931	19,50 9,70 10,14 11,77 10,27	19,55 9,99 10,71 13,18 12,88	20,24 10,23 12,01 19,12 20,85	0,729 0,744 0,768 0,858 0,932			
					7 <sup>h</sup> 45'—11 <sup>h</sup> 45'							
					11 45—13 45							
					13 45—15 45							
					15 45—17 45							
					17 45—19 45							
Zusammen: bestimmt	60,78											
berechnet	61,58											

\* 1 = Absolute Ruhe. 2 = Vereinzelte Bewegungen. 3 = Wenige Bewegungen<sup>en</sup>.

Fleischversuche.

Wärmeabgabe pro 24 <sup>h</sup> durch			Korrekt. für die Wärme- produktion	Wärme- produktion pro qm Körperober- fläche und 24 <sup>h</sup>		Cal O <sub>2</sub>	Bemerkung	Verhalten des Tieres*	
Strah- lung	Wasser- ver- dampfung	Ventil		Cal	Cal				Cal
225,8	65,2	30,9	-6,2	629	649	4,57	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2	
216,9	45,5	44,5	-6,2	599	606	4,62	I. Normalperiode	2	
228,1	55,3	40,3	-6,2	635	643	4,63	II. „	2	
242,2	80,2	52,3	+1,2	749	868	4,10	I. Fütterungsperiode, 289,1 g Fleisch	2	
287,6	118,4	53,8	+1,2	919	941	4,71	II. „	4	
274,7	108,5	67,7	+1,2	903	860	4,93	III. „	2	
262,7	74,7	35,9	+21,6	779	799	4,57	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	1	
257,6	73,6	50,2	+21,6	797	815	4,57	I. Normalperiode	1	
266,6	73,7	48,2	+21,6	809	814	4,64	II. „	1	
274,6	106,9	60,9	+20,6	914	830	5,36	I. Fütterungsperiode, 263,2 g Fleisch	2	
286,4	104,5	55,3	+20,6	921	939	4,63	II. „	1	
286,4	133,5	64,5	+20,6	997	963	4,92	III. „	2	
297,1	169,1	59,4	+20,6	1078	1026	5,01	IV. „	3	
289,7	136,0	68,3	+20,6	1016	973	4,97	V. „	1	
220,1	84,7	32,4	0,0	693	719	4,33	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	1	
217,1	57,1	41,2	0,0	648	684	4,43	I. Normalperiode	1	
217,2	52,0	38,8	0,0	633	685	4,30	II. „	1	
225,5	62,7	45,4	+0,2	686	812	3,96	I. Fütterungsperiode, 152,8 g Fleisch	1	
257,8	85,1	47,7	+0,2	803	788	4,87	II. „	1	
237,2	103,1	54,6	+0,2	812	730	5,37	III. „	2	
227,7	93,8	46,3	+0,2	756	742	4,76	IV. „ (38,7 g Harn)	1	
227,6	101,2	52,6	+0,2	784	856	4,28	V. „	1	
255,9	70,6	38,3	+ 5,0	735	762	4,51	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	1	
255,9	71,4	47,9	+ 5,0	755	760	4,67	I. Normalperiode	1	
259,5	83,8	47,8	+ 5,0	787	797	4,65	II. „	1	
273,9	133,4	57,0	+14,0	930	902	4,99	I. Fütterungsperiode, 141,8 g Fleisch	3	
287,1	145,5	57,6	+14,0	1000	843	5,85	II. „	2	

4 = Ziemlich ruhig. 5 = Unruhig.



Generaltabelle I.

Versuch	Tier	Gewicht des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Temperatur des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Mittlere Temperatur des Tierbehälters	Datum	Sauerstoffverbrauch	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	RQ.		
Nr.	Nr.	g	°C	°C		g	g	g			
33	1	10045,0 9981,0	38,2 38,6	25,2 25,9	27. X. 1931						
					8 <sup>h</sup> —12 <sup>h</sup>	21,90	20,43	21,40	0,687		
						12—14	10,46	10,61	12,16	0,738	
						26,2	10,72	11,18	12,08	0,758	
						26,4	11,80	11,68	13,78	0,720	
						26,5	11,01	11,96	14,36	0,790	
						26,6	11,40	13,20	15,54	0,842	
						26,6	14,61	16,06	27,60	0,799	
						26,7	13,51	14,33	26,16	0,771	
							Zusammen: bestimmt	105,41			
							berechnet	106,28			
		36	2	8871,2 8831,5	38,4 38,3	24,4 24,7	6. XI. 1931				
							7 <sup>h</sup> 45'—11 <sup>h</sup> 45'	15,48	15,64	14,33	0,734
						11 45—13 45	7,83	8,16	6,03	0,758	
						24,8	7,67	8,05	6,21	0,763	
						25,2	9,01	9,50	7,71	0,767	
						25,5	9,35	9,92	9,67	0,772	
						25,6	9,22	9,48	11,20	0,748	
						25,2	8,35	8,88	12,79	0,774	
						25,3	8,54	9,40	12,68	0,800	
							Zusammen: bestimmt	75,45			
							berechnet	76,50			
38	1			9881,4 9815,7	37,3 38,5	24,4 25,2	13. XI. 1931				
							7 <sup>h</sup> 45'—11 <sup>h</sup> 45'	23,64	23,40	24,44	0,720
						11 45—13 45	11,32	11,55	11,58	0,742	
						25,6	11,16	11,24	11,04	0,733	
						25,5	12,36	11,99	13,03	0,705	
						25,6	10,93	12,35	14,78	0,822	
						25,7	11,85	12,37	14,32	0,759	
						25,6	11,63	12,40	16,06	0,775	
						25,7	12,33	12,37	14,63	0,730	
							Zusammen: bestimmt	105,22			
							berechnet	106,14			
		40	2	9168,1 9144,1	38,6 38,5	24,1 24,6	20. XI. 1931				
							7 <sup>h</sup> 50'—11 <sup>h</sup> 50'	18,37	18,75	15,91	0,742
						11 50—13 50	8,88	8,33	5,71	0,734	
						25,0	8,88	9,50	7,69	0,734	
						25,3	9,37	10,16	8,35	0,789	
						25,4	8,66	10,06	8,46	0,845	
						25,4	8,68	9,46	7,83	0,791	
						25,7	9,61	9,78	9,59	0,740	
						25,9	9,60	10,06	9,00	0,764	
							Zusammen: bestimmt	82,05			
							berechnet	80,99			

\* 1 = Absolute Ruhe. 2 = Vereinzelte Bewegungen. 3 = Wenige Bewegungen.

(Fortsetzung.)

Wärmeabgabe pro 24 <sup>h</sup> durch			Korrekt. für die Wärme- produktion	Wärme- produktion pro qm Körperober- fläche und 24 <sup>h</sup>		Cal O <sub>2</sub>	Bemerkung	Verhalten des Tieres*	
Strah- lung	Wasser- ver- dampfung	Ventil		Cal	be-				be-
					stimmt				rechnet
Cal	Cal	Cal	Cal	Cal	Cal				
261,7	74,7	44,9	+7,6	747	826	4,23	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten		
275,6	84,8	52,7	+7,6	809	792	4,79	I. Normalperiode		
277,5	84,3	54,0	+7,6	814	803	4,70	II. "		
283,6	96,1	59,8	+7,9	860	889	4,57	I. Fütterungsperiode, 82,2gFleisch		
291,9	100,1	57,8	+7,9	880	845	4,95	II. "		
299,0	108,4	64,8	+7,9	923	887	5,02	III. "		
309,7	192,6	62,9	+7,9	1102	1124	4,67	IV. " (bewegt sich)		
302,4	182,5	71,1	+7,9	1084	1032	4,97	V. " (bewegt sich)		
214,7	50,0	32,5	-4,2	610	635	4,51	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	1	
213,1	42,1	39,1	-4,2	604	646	4,41	I. Normalperiode	1	
217,2	43,3	42,4	-4,2	622	634	4,64	II. "	1	
227,5	53,8	42,7	-2,2	670	745	4,25	I. Fütterungsperiode, 83,0gFleisch	1	
243,5	67,5	46,6	-2,2	741	775	4,53	II. "	2	
250,4	78,1	52,7	-2,2	790	759	4,90	III. "	2	
218,4	89,2	46,2	-2,2	733	693	5,01	IV. " (39,4 g Harn)	1	
230,3	88,5	45,1	-2,2	754	713	5,04	V. "	1	
291,6	85,3	47,7	+27,6	879	901	4,56	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2	
297,4	80,8	58,2	+27,6	902	867	4,87	I. Normalperiode	2	
299,0	77,0	63,7	+27,6	908	853	4,99	II. "	2	
302,0	90,9	61,9	+23,4	929	942	4,61	I. Fütterungsperiode, 55,7gFleisch	2	
303,9	103,1	65,1	+23,4	963	855	5,40	II. "	2	
309,2	99,9	64,9	+23,4	967	913	5,00	III. "	3	
300,2	112,1	66,8	+23,4	976	899	5,14	IV. "	2	
306,4	102,0	63,1	+23,4	962	942	4,78	V. "	2	
242,5	55,5	31,1	-3,6	664	739	4,26	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	1	
231,9	39,8	35,0	-3,6	618	682	4,07	I. Normalperiode	1	
241,0	53,7	40,8	-3,6	677	682	4,45	II. "	1	
249,7	58,3	46,6	+1,0	725	757	4,52	I. Fütterungsperiode, 53,6gFleisch	1	
254,3	59,0	49,2	+1,0	742	716	5,01	II. "	1	
252,5	54,6	48,9	+1,0	728	709	4,89	III. "	1	
262,3	66,9	53,3	+1,0	782	773	4,76	IV. "	2	
268,6	62,8	54,4	+1,0	789	776	4,80	V. "	2	

4 = Ziemlich ruhig. 5 = Unruhig.

Generaltabelle II.

Versuch	Tier	Gewicht des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Temperatur des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Mittlere Temperatur des Tierbehälters	Datum	Sauerstoffverbrauch	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	Rq.
Nr.	Nr.	g	°C	°C		g	g	g	
42	7	8754,2 8942,6	38,7 38,8	24,5 25,0 25,1 25,4 25,6 25,9 25,8 25,8	27. XI. 1931	23,00 10,72 10,38 13,10 12,67 13,75 13,29 11,68	24,32 10,61 10,11 13,32 12,61 13,30 13,96 12,51	28,49 11,17 10,57 15,72 19,24 21,49 27,28 15,58	0,769 0,720 0,708 0,740 0,724 0,705 0,769 0,779
					7 <sup>h</sup> 45'—11 <sup>h</sup> 45'				
					11 45—13 45				
					13 45—15 45				
					15 45—17 45				
					17 45—19 45				
					19 45—21 45				
					21 45—23 45				
					23 45— 1 45				
					Zusammen: bestimmt berechnet				
44	2	9321,0 9590,0	38,7 38,8	24,0 24,5 24,9 24,5 25,0 25,2 25,4 25,5	4. XII. 1931	18,34 9,30 9,49 11,05 10,73 11,85 10,36 10,32	18,94 9,94 10,31 12,49 12,20 12,11 11,69 11,51	15,95 7,43 8,57 14,72 15,51 17,06 15,67 11,79	0,751 0,777 0,790 0,822 0,827 0,743 0,821 0,811
					7 <sup>h</sup> 45'—11 <sup>h</sup> 45'				
					11 45—13 45				
					13 45—15 45				
					15 45—17 45				
					17 45—19 45				
					19 45—21 45				
					21 45—23 45				
					23 45— 1 45				
					Zusammen: bestimmt berechnet				
45	7	9519,8 9477,3	38,6 38,7	24,7 25,1 25,1 25,5 25,3 25,5 25,5 25,2	11. XII. 1931	24,02 10,76 10,92 14,05 12,00 13,21 14,46 12,54	23,93 10,82 10,92 14,13 12,20 13,85 15,78 13,43	29,83 10,83 10,58 28,24 20,59 24,16 38,03 31,80	0,725 0,731 0,727 0,732 0,739 0,763 0,793 0,779
					8 <sup>h</sup> —12 <sup>h</sup>				
					12 —14				
					14 —16				
					16 —18				
					18 —20				
					20 —22				
					22 —24				
					24 — 2				
					Zusammen: bestimmt berechnet				
46	2	9217,6 9323,0	38,4 38,7	24,3 24,8 24,9 24,9 25,0 25,2 25,4 25,7	15. XII. 1931	17,62 8,69 9,05 10,56 9,79 10,06 10,47 10,68	17,70 9,20 9,63 10,94 11,28 10,51 11,01 11,74	16,10 7,83 8,45 16,51 12,38 11,58 11,85 13,45	0,730 0,770 0,774 0,753 0,838 0,759 0,766 0,799
					7 <sup>h</sup> 45'—11 <sup>h</sup> 45'				
					11 45—13 45				
					13 45—15 45				
					15 45—17 45				
					17 45—19 45				
					19 45—21 45				
					21 45—23 45				
					23 45— 1 45				
					Zusammen: bestimmt berechnet				

\* 1 = Absolute Ruhe. 2 = Vereinzelte Bewegungen. 3 = Wenige Bewegungen.

## Eiklarversuche.

Wärmeabgabe pro 24 <sup>h</sup> durch			Korrekt. für die Wärme- produktion	Wärme- produktion pro qm Körperober- fläche und 24 <sup>h</sup>		Cal O <sub>2</sub>	Bemerkung	Verhalten des Tieres*	
Strah- lung	Wasser- ver- dampfung	Ventil		Cal	be-				
					stimmt				rechnet
Cal	Cal	Cal	Cal	Cal	Cal				
286,6	99,4	53,4	-0,5	848	883	4,55	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2	
279,3	77,9	55,7	-0,5	797	813	4,58	I. Normalperiode	1	
268,4	73,8	61,5	-0,5	779	787	4,63	II. "	1	
272,6	109,7	56,5	+5,5	859	998	4,04	I. Fütterungsperiode, 340,7g Eiklar	2	
277,8	134,3	63,7	+5,5	930	961	4,52	II. "	1	
256,6	149,7	60,6	+5,5	971	1043	4,35	III. "	1	
283,8	190,3	63,3	+5,5	1049	1020	4,86	IV. "	2	
283,7	108,7	56,8	+5,5	879	899	4,64	V. "	1	
254,7	55,6	28,0	+0,4	677	724	4,40	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	1	
250,5	51,9	31,2	+0,4	667	739	4,28	I. Normalperiode	1	
257,6	59,8	42,9	+0,4	720	758	4,53	II. "	1	
246,1	102,7	38,1	+8,3	790	888	4,20	I. Fütterungsperiode, 382,7g Eiklar	1	
260,4	108,2	43,1	+8,3	839	864	4,66	II. "	1	
283,5	119,0	44,6	+8,3	910	934	4,58	III. "	1	
280,5	109,3	53,7	+8,3	902	833	5,19	IV. "	1	
283,2	82,3	49,3	+8,3	845	828	4,88	V. "	1	
289,0	104,1	50,6	-0,7	882	939	4,39	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2	
279,0	75,6	50,5	-0,7	805	842	4,48	I. Normalperiode	1	
281,8	73,8	59,0	-0,7	824	854	4,51	II. "	1	
273,0	197,1	49,6	+0,7	1036	1103	4,40	I. Fütterungsperiode, 223,6g Eiklar	2	
274,2	143,7	58,3	+0,7	949	941	4,73	II. "	1	
294,5	168,6	52,8	+0,7	1028	1043	4,66	III. " (65,9 g Harn)	1	
292,2	265,4	62,0	+0,7	1235	1150	5,11	IV. "	2	
258,4	221,9	52,1	+0,7	1061	994	5,06	V. "	2	
232,3	56,2	38,0	+5,4	671	701	4,49	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	1	
247,5	55,2	38,4	+5,4	701	699	4,75	I. Normalperiode	1	
242,1	59,0	50,0	+5,4	721	728	4,69	II. "	1	
227,6	115,2	38,4	+7,2	786	845	4,38	I. Fütterungsperiode, 212,4g Eiklar	1	
243,3	86,4	45,3	+7,2	773	801	4,65	II. "	1	
251,0	80,8	39,3	+7,2	765	806	4,48	III. "	1	
262,9	83,4	56,3	+7,2	829	841	4,77	IV. "	1	
276,9	93,9	47,5	+7,2	861	865	4,75	V. "	1	

4 = Ziemlich ruhig. 5 = Unruhig.

## Generaltabelle II.

Versuch	Tier	Gewicht des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Temperatur des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Mittlere Temperatur des Tierbehälters	Datum	Sauerstoffverbrauch	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	RQ.
Nr.	Nr.	g	°C	°C		g	g	g	
47	7	9482,5 9513,2	38,6 38,7	24,3 24,8 24,9 25,1 24,9 24,8 24,8 24,9	18. XII. 1931	23,79 9,83 10,60 13,11 10,75 12,06 10,99 10,72	23,52 10,13 10,62 12,83 11,88 11,93 11,14 10,87	30,38 10,22 10,44 18,61 16,80 18,52 14,03 13,50	0,719 0,749 0,725 0,712 0,804 0,719 0,737 0,737
					7 <sup>h</sup> 50'—11 <sup>h</sup> 50'				
					11 50—13 50				
					13 50—15 50				
					15 50—17 50				
					17 50—19 50				
					19 50—21 50				
					21 50—23 50				
					23 50— 1 50				
					Zusammen: bestimmt berechnet				
52	2	9194,8 9198,2	38,4 38,9	23,9 24,2 24,5 24,7 24,8 24,9 25,2 25,4	12. I. 1932	19,16 9,01 9,01 10,57 9,28 10,36 10,67 11,70	19,49 8,76 9,57 10,30 10,83 10,98 11,25 12,57	26,33 10,61 12,33 12,80 14,95 14,59 14,89 12,80	0,740 0,707 0,772 0,709 0,849 0,771 0,767 0,781
					8 <sup>h</sup> —12 <sup>h</sup>				
					12—14				
					14—16				
					16—18				
					18—20				
					20—22				
					22—24				
					24— 2				
					Zusammen: bestimmt berechnet				
50	7	9919,8 9784,7	38,4 38,3	24,7 25,1 24,8 24,0 25,2 25,3 25,2 25,1	5. I. 1932	24,71 10,91 12,56 12,79 12,49 12,34 11,79 10,96	24,48 11,70 12,92 12,60 13,66 12,91 12,40 11,94	31,76 12,98 21,45 19,56 23,07 21,52 22,12 17,39	0,717 0,780 0,748 0,712 0,795 0,761 0,765 0,792
					8 <sup>h</sup> —12 <sup>h</sup>				
					12—14				
					14—16				
					16—18				
					18—20				
					20—22				
					22—24				
					24— 2				
					Zusammen: bestimmt berechnet				
54	2	8803,2 8790,2	38,5 38,3	23,9 24,2 24,4 24,3 24,2 24,3 24,2 24,1	9. II. 1932	— — 8,84 10,39 9,00 9,25 8,08 8,62	19,26 9,35 8,70 10,35 8,87 9,71 9,21 8,92	18,15 8,18 8,17 16,82 14,53 12,65 10,95 10,10	— — 0,716 0,724 0,717 0,763 0,829 0,753
					7 <sup>h</sup> 45'—11 <sup>h</sup> 45'				
					11 45—13 45				
					13 45—15 45				
					15 45—17 45				
					17 45—19 45				
					19 45—21 45				
					21 45—23 45				
					23 45— 1 45				
					Zusammen: bestimmt berechnet				

\* 1 = Absolute Ruhe. 2 = Vereinzelte Bewegungen. 3 = Wenige Bewegungen.

(Fortsetzung.)

Wärmeabgabe pro 24 <sup>h</sup> durch			Korrekt. für die Wärme- produktion	Wärme- produktion pro qm Körperober- fläche und 24 <sup>h</sup>		Cal O <sub>2</sub>	Bemerkung	Verhalten des Tieres*	
Strah- lung	Wasser- ver- dampfung	Ventil		Cal	be- stimmt				be- rechnet
281,2	106,0	50,9	+0,3	873	929	4,39	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2	
278,4	71,3	50,8	+0,3	798	773	4,86	I. Normalperiode	1	
280,6	72,9	61,0	+0,3	826	833	4,63	II. „	2	
280,3	129,8	49,2	+1,1	917	1024	4,18	I. Fütterungsperiode, 165,1gEiklar	2	
270,6	127,3	63,3	+1,1	901	858	5,01	II. „	1	
284,3	129,2	53,4	+1,1	932	942	4,62	III. „	2	
280,3	97,9	62,1	+1,1	879	862	4,78	IV. „	1	
279,2	94,2	52,3	+1,1	850	840	4,74	V. „	2	
235,9	91,5	33,5	+9,5	768	753	4,60	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	1	
231,3	74,1	31,0	+9,4	719	703	4,58	I. Normalperiode	1	
231,9	86,0	42,1	+9,4	729	751	4,88	II. „	1	
239,1	89,3	35,9	+7,7	844	755	4,19	I. Fütterungsperiode, 143,7gEiklar	1	
248,8	104,3	46,0	+7,7	748	827	5,22	II. „	1	
260,9	101,8	39,4	+7,7	838	833	4,82	III. „	1	
259,6	103,9	51,1	+7,7	862	857	4,70	IV. „	1	
289,3	127,0	45,6	+7,7	948	954	4,78	V. „ (12,8 g Harn)	1	
289,8	110,8	47,1	-5,0	860	942	4,27	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2	
296,9	90,6	46,7	-5,0	834	845	4,68	I. Normalperiode	1	
279,9	149,7	57,6	-5,0	936	964	4,57	II. „	2	
287,8	136,5	45,7	-3,5	906	975	4,34	I. Fütterungsperiode, 86,2gEiklar	2	
290,6	161,0	57,4	-3,5	982	971	4,82	II. „	1	
295,7	150,2	45,8	-3,5	944	950	4,71	III. „	2	
279,7	154,4	57,6	-3,5	948	909	4,93	IV. „	2	
267,6	121,4	45,2	-3,5	837	851	4,68	V. „	1	
260,5	63,3	29,5	-6,0	728	—	—	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	1	
256,7	57,1	28,9	-6,0	705	—	—	I. Normalperiode	1	
250,4	57,3	35,7	-6,0	706	727	4,54	II. „	1	
236,5	117,4	29,9	-4,4	795	854	4,35	I. Fütterungsperiode, 88,9gEiklar	1	
232,6	101,4	36,4	-4,4	767	740	4,84	II. „	1	
240,1	88,3	30,1	-4,4	742	769	4,56	III. „	1	
239,9	76,4	37,5	-4,4	732	683	5,15	IV. „	1	
243,4	70,5	31,6	-4,4	715	714	4,71	V. „	1	

4 = Ziemlich ruhig. 5 = Unruhig.

Die Versuchsdaten der mit Pferdefleisch ausgeführten Versuche sind in Generaltabelle I, jene mit Eiklar in Generaltabelle II angeführt. Zu Vergleichszwecken sind diesen Generaltabellen die entsprechenden Werte für die Texttabellen entnommen. In die Generaltabellen haben wir zwar die Vorperioden der Versuche aufgenommen, doch beginnen die eigentlichen Versuche erst mit den beiden Normalperioden (I. und II. normale Periode) zur Kontrolle des Grundumsatzes, denen dann die Fütterungsperioden I bis V folgten.

b) *Direkt und indirekt bestimmter Sauerstoffverbrauch.*

In den Generaltabellen ist der direkte Sauerstoffverbrauch summarisch mit dem aus dem Gewichtsverlust des Tieres, Nahrungsaufnahme, Kohlensäure- und Wasserabgabe berechneten Sauerstoffverbrauch verglichen. In der Tabelle II sind die Differenzen zwischen direkt und indirekt bestimmtem Sauerstoffverbrauch angegeben. Wie aus ihr hervorgeht, sind die größten Unterschiede  $-2,9$  und  $+3,0\%$ . *Als Mittelwert der Differenzen von 16 Versuchen erhalten wir zwischen direkter und indirekter Bestimmung eine Differenz von nur  $+0,2\%$ .*

Tabelle II.

Versuch Nr.	Abweichung des berechneten Sauerstoffverbrauchs von dem direkt bestimmten um	Versuch Nr.	Abweichung des berechneten Sauerstoffverbrauchs von dem direkt bestimmten um
28	+ 1,7 %	42	- 0,6 %
29	+ 0,3	44	+ 0,8
30	- 0,9	45	- 2,9
31	+ 1,3	46	- 1,6
33	+ 0,8	47	- 0,8
36	+ 1,0	50	+ 3,0
38	+ 0,9	52	+ 1,3
40	- 1,3		

Mittelwert:  $+0,2\%$ .

c) *Über die Übereinstimmung der direkt gemessenen Wärmeproduktion mit der aus dem Sauerstoffverbrauch berechneten.*

Diese Übereinstimmung von direkt bestimmtem und berechnetem Sauerstoffverbrauch erlaubt uns die Verwendung dieser Werte von verbrauchtem Sauerstoff zur Berechnung der Wärmeproduktion. In der Generaltabelle ist die Wärmeproduktion pro 24 Stunden und Quadratmeter Körperoberfläche angegeben, und zwar nebeneinander die direkt bestimmte und die aus dem Sauerstoffverbrauch berechnete Wärmeproduktion (direkte und indirekte Kalorimetrie). In der Tabelle III haben wir die Mittelwerte aus sämtlichen Perioden der direkten und indirekten Kalorimetrie der einzelnen Versuche zu Vergleichszwecken angeführt.

Tabelle III.

Versuch Nr.	Mittlere Wärmeproduktion pro qm Oberfläche und 24 Std.		Abweichung der berechneten Wärmeproduktion von der bestimmten um
	bestimmt Cal	berechnet Cal	
28	739	761	+ 3,0 %
29	914	895	- 2,1
30	727	752	+ 3,4
31	841	813	- 3,3
33	902	899	- 0,3
36	691	700	+ 1,4
38	936	897	- 4,2
40	718	729	+ 1,9
42	889	926	+ 4,1
44	793	821	+ 3,6
45	978	983	+ 0,6
46	763	786	+ 2,2
47	872	883	+ 1,2
50	906	926	+ 2,2
52	807	807	0
54	557	561	+ 0,7
		Mittelwert:	+ 0,7 %

Die Unterschiede schwanken also von  $-4,2$  bis  $+4,0$  % und betragen im Mittel  $+0,7$  %.

#### d) Grundumsatz.

In den Tabellen IV und V sind die Werte für die Wärmeproduktion zwecks besserer Übersicht der mit Fleisch und Eiklar ausgeführten Versuche pro 24 Stunden und Quadratmeter Körperoberfläche getrennt angeführt und nach abfallenden Eiweißgaben geordnet. Zwecks Vergleichsmöglichkeit ist als Grundumsatz der Mittelwert der beiden Normalperioden angeführt. Dieser letztere differiert zwar bei den verschiedenen Tieren und auch bei denselben Tieren in verschiedenen Versuchen, doch beträgt die Differenz bei ein und demselben Tiere nicht mehr als 12 %. Diese Änderungen im Grundumsatz dürfen vielleicht darauf bezogen werden, daß die Tiere in der versuchsfreien Zeit nicht bei der immer streng gleichen Kost gehalten wurden und sich außerdem auch im Gegensatz zu den Hunden von *Lusk* in einem größeren Käfig frei bewegen konnten. Der Grundumsatz von Versuchstier Nr. 1 und 7 schwankt zwischen 800 und 900, der des Versuchstieres Nr. 2 zwischen 600 und 700 Cal und beträgt im Mittel:

bei Versuchstier Nr. 1 bei direkter Kalorimetrie	825,	bei indirekter	813 Cal
„ „ „ 2 „ „ „	669,	„ „	694 „
„ „ „ 7 „ „ „	825,	„ „	825 „

Die kleine Zusammenstellung zeigt abermals eine Übereinstimmung von direkter und indirekter Kalorimetrie.

#### e) Zusammenstellung der Nahrung.

Die verabreichten Nahrungsmittel wurden vor jedem Versuch auf C-, N- und Aschengehalt untersucht und außerdem die in Äther löslichen Extraktivstoffe bestimmt. Auf Grund dieser Bestimmungen konnten wir



Tabelle IV.

Hand Nr.	Ver- such Nr.	Ge- fütterte Fleisch- menge g	Direkte Kalorimetrie							Indirekte Kalorimetrie							Mittlerer Wärme- zuwachs aus den an- geführten Perioden der direkten und indirekten Kalorimetrie in o/o
			Wärmeproduktion in Cal pro 24 Std. und qm Körperoberfläche			Stunden nach der Fütterung				Wärmeproduktion in Cal pro 24 Std. und qm Körperoberfläche			Stunden nach der Fütterung				
			Grund- umsatz	2	4	6	8	10	Grund- umsatz	2	4	6	8	10			
2	28	289,1	617	749	919	903	—	—	625	868	941	860	—	—	39,6		
1	29	263,2	803	132 21,4	302 48,9	286 46,4	—	—	815	243 38,9	316 50,6	235 37,6	—	—	21,2		
2	30	152,8	640	914 111 13,8	921 118 14,7	997 194 24,2	1078 275 34,3	1016 218 26,5	685	880 15 18,4	939 124 15,2	963 148 18,2	1026 211 25,9	973 158 19,8	17,8		
1	31	141,8	771	686 46 7,3	803 163 25,9	812 172 27,3	756 116 18,4	784 144 22,9	779	812 137 20,0	730 103 15,0	742 45 6,6	856 57 8,3	25,0	16,0		
1	33	82,2	812	930 159 17,2	1000 229	—	—	—	797	902 123 15,5	843 64 8,3	—	—	—	9,5		
2	36	83,0	613	860 48 5,9	880 68 8,4	923 111 13,7	—	—	640	889 92 11,5	845 48 6,0	887 90 11,3	—	—	17,7		
1	38	55,7	905	670 57 9,3	741 128 20,9	790 177 28,0	733 120 19,6	754 141 23,0	860	745 105 16,4	775 135 21,0	759 119 18,6	693 53 8,3	713 73 11,4	6,2		
2	40	53,6	647	929 24 2,7	963 58 6,4	967 62 6,7	976 71 7,8	962 57 6,3	682	942 82 12,0	855 5 —0,6	913 53 6,1	899 39 4,5	942 82 9,5	9,8		

Tabelle V.

Hund Nr.	Ver- such Nr.	Ge- fütterte Ekkiar- menge g	Direkte Kalorimetrie Wärmeproduktion in Cal pro 24 Std. und qm Körperoberfläche					Indirekte Kalorimetrie Wärmeproduktion in Cal pro 24 Std. und qm Körperoberfläche					Mittlerer Wärmezunachs aus den angeführten Perioden der direkten und in- direkten Kalorimetrie in %		
			Stunden nach der Fütterung					Stunden nach der Fütterung							
			Grund- umsatz	2	4	6	8	10	Grund- umsatz	2	4	6		8	10
7	42	340,7	788	859 71 9,0	937 142 18,0	971 183 23,2	1049 261 33,1	879 91 11,6	800	998 198 24,7	961 161 20,7	1043 243 30,4	1020 220 27,5	899 99 12,4	21,0
2	44	382,7	698	790 97 14,0	839 146 21,1	910 217 31,3	902 209 30,2	845 152 22,0	747	888 141 18,9	864 117 15,7	934 187 25,0	883 86 11,3	828 81 10,8	20,0
7	45	223,6	815	1036 221 27,1	949 134 16,4	— — —	— — —	— — —	848	1103 255 30,1	941 93 11,0	— — —	— — —	— — —	21,2
2	46	212,4	711	786 75 10,6	773 62 8,8	765 54 7,6	829 118 16,6	861 150 21,1	714	845 131 18,4	801 87 12,2	806 92 12,9	841 127 17,8	865 151 21,1	14,7
7	47	165,1	812	917 105 12,9	971 89 11,0	932 120 14,8	879 67 8,3	850 38 4,7	803	1024 221 27,8	858 55 6,9	942 139 17,3	862 59 7,4	843 40 5,0	11,6
2	52	143,7	724	844 124 17,1	748 24 3,4	838 114 15,7	862 138 19,1	— — —	727	755 28 3,9	827 100 13,8	833 106 14,6	857 130 17,9	— — —	13,2
7	50	86,2	834	906 72 8,6	982 148 17,8	944 110 13,2	948 114 13,7	837 3 0,4	845	975 130 15,4	971 126 14,9	950 105 12,4	909 64 7,5	851 6 0,7	10,5
2	54	88,9	706	795 89 12,6	767 61 8,7	742 36 5,1	782 26 3,7	715 9 1,2	727	854 127 17,5	740 13 1,8	769 42 5,8	683 -44 -6,1	714 -7 -1,0	5,0

den Eiweiß, Kohlenhydrat und Fettgehalt der Nahrung berechnen. Die Bestimmung des C erfolgte nach *Messinger-Huppert* in der *Tangl-Kereszty*-schen Modifikation, die des N nach *Kjeldahl*, die der Fette nach *Soxhlet*. Die Verbrennungswärme wurde mit Hilfe der *Berthelotschen Bombe* festgestellt.

Die so erhaltenen Analysenwerte sind in Tabelle VI zusammengestellt. Die Kalorienmenge, die der vom Tier aufgenommenen Nahrung entspricht, konnte durch Multiplikation aus der verzehrten Nahrungsmenge und ihrer chemischen Energie erhalten werden. Die nutzbare Energie der verzehrten Nahrungsmittelmenge wurde, wie *Benedict* und *Carpenter* (30) angeben, durch Multiplikation des Eiweißgehaltes mit 1,4 und Subtraktion des so erhaltenen Wertes von dem chemischen Energiegehalt des betreffenden Nahrungsmittels pro g erhalten. Die in der Tabelle VI angegebenen Werte sind auf die verzehrten Nahrungsmittelwerte umgerechnet.

f) *Der Einfluß der verabreichten Nahrung auf die Wärmeproduktion.*

In den Tabellen IV und V gilt für die Werte jeweils der ersten Zeile der einzelnen Versuche der Tabellenkopf, in der zweiten Zeile ist die Steigerung der Wärmeproduktion der betreffenden Periode in bezug auf den Grundumsatzwert in Kalorien, in der dritten Zeile in Prozenten angegeben. In diese Tabellen haben wir die Werte jener Perioden nicht eingetragen, in denen die Tiere, wie aus den Werten der Generaltabelle hervorgeht, merklich unruhig waren oder uriniert haben.

Nach der Nahrungsdarreichung im Kalorimeter begannen die Versuchstiere sofort zu fressen, sobald die Fütterungsvorrichtung geöffnet wurde. Je nach der Nahrungsmenge wurde sie in 2 bis 5 Minuten vollständig verzehrt. Die Tiere legten sich hierauf regelmäßig und verhielten sich ruhig. Da das Galvanometer bei Steigerung der durch Strahlung abgegebenen Wärme einen Ausschlag nach rechts, bei Verminderung hingegen nach links zeigte, konnten wir während der einzelnen Perioden die Änderungen der durch Strahlung abgegebenen Wärmemenge dauernd beobachten und durch Ablesungen nach je 10 Minuten festhalten. Nach Fleischfütterung war ein Galvanometerausschlag nach rechts in der ersten Stunde nach der Fütterung kaum zu merken, im Gegensatz zu durchgeführten Scheinfütterungsversuchen und Bewegungen des Tieres, bei denen sich immer ein merklicher Galvanometerausschlag nach rechts zeigte. (Die Scheinfütterungsversuche wurden zu dem Zwecke ausgeführt, um den Einfluß der Futterdarreichung an sich auf den Energieumsatz beurteilen zu können.) Erst am Ende der ersten Stunde und am Beginn der zweiten begannen sich nach Fleischfütterung die Galvanometerausschläge nach rechts zu vergrößern, um dann erst in der zweiten Periode gewaltig im Verhältnis zur dargereichten Nahrungsmittelmenge anzusteigen. Die auf die Wasserverdunstung entfallende Wärmeabgabe verfolgten wir während der Versuchsperioden mit Hilfe eines an einer im Tierkäfig von außen sichtbaren Stelle aufgehängten Haarhygrometers, an dem

Tabelle VI.

Versuch Nr.	Verzehrt Nahrungsmittel- menge. g	100 g frische Nahrung enthält							Chem. Energie Cal	Die verzehrte Nahrungsmittel- menge enthält Cal	Nutzbare Energie- menge der verzehrten Nahrung Cal
		N g	C g	Eiweiß g	Fett g	Asche g	Kohlen- hydrate g	—			
28	289,1	3,20	12,05	20,03	1,53	0,940	0,59	123,4	356,7	275,8	
29	263,2	3,24	12,07	20,22	1,71	0,778	0,42	124,2	326,9	252,4	
30	152,8	3,30	12,50	20,63	1,60	0,933	0,98	134,1	204,9	160,7	
31	141,8	3,36	14,05	21,00	3,30	0,770	2,23	157,8	223,8	182,2	
33	82,2	3,32	14,88	20,75	3,73	0,934	3,55	153,9	126,5	102,6	
36	83,0	3,31	13,70	20,71	2,08	0,951	3,09	149,8	125,3	100,3	
38	55,7	3,36	16,79	21,02	6,81	0,989	0,94	172,5	96,1	79,7	
40	53,6	3,34	11,16	21,29	3,02	0,939	1,19	142,4	76,3	60,3	
42	340,7	2,25	—	14,07	1,13	2,06	—	81,80	278,8	211,6	
44	382,7	1,97	—	12,33	0,87	2,04	—	75,78	289,2	223,2	
45	223,6	2,02	—	12,63	0,41	2,50	—	72,20	161,5	121,9	
46	212,4	2,12	—	13,26	0,29	2,98	—	74,50	158,2	118,8	
47	165,1	2,05	—	12,82	0,16	2,85	—	70,20	115,9	86,3	
52	143,7	2,12	—	13,26	0,40	3,05	—	74,52	107,1	80,4	
50	86,2	2,22	—	13,88	0,18	2,80	—	76,60	66,0	49,3	
54	88,9	—	—	—	—	2,72	—	—	65,8*	49,6*	

\* 13% Eiweiß berechnet.

halbstündliche Ablesungen vorgenommen wurden. (Bemerkt sei, daß wir aus der plötzlichen Steigerung des Hygrometers auch entnehmen konnten, wann das Tier urinierte.) Das in der ersten Periode nach Fleischfütterung abgegebene Wärmeplus entfällt, wie wir feststellen konnten, vornehmlich auf die Wasserabgabe, worüber bei der Besprechung des Wasserumsatzes ausführlich die Rede sein soll. Nach Verfütterung von Eiklar beobachteten wir in den ersten beiden Stunden einen Galvanometerausschlag nach links. Es hatte sich daher die Wärmeabgabe durch Strahlung vermindert. In derselben Zeit aber konnten wir eine Steigerung des Hygrometers feststellen, so daß hier das gesamte Wärmeplus bei der Wasserverdunstung erscheint. Auffallend war, daß nach Fleischfütterung die Temperatur im Kalorimeterraum in der ersten Periode eine steigende Tendenz aufwies, nach Eiklarfütterung zur selben Zeit hingegen eher sank.

Die Tatsache, daß wir in der ersten Periode nach Fleischfütterung eine nur geringe Erhöhung der Strahlungswärme, nach Eiklarfütterung sogar eine Verminderung der Wärmestrahlung feststellen konnten, möchten wir mit der Erweiterung der Splanchnicusgefäße infolge der Verdauung in Zusammenhang bringen, durch die es zu einer größeren Wärmestauung in den inneren Organen kommen muß, während an die Körperoberfläche infolge geringerer Durchblutung der Hautgefäße nicht so viel Wärme vordringen und dann auch nicht durch Strahlung abgegeben werden kann. Für die erhöhte Abgabe von Wasserdampf dürften die Erweiterung der Blutgefäße und Wärmestauung im Körperinnern und der intermediäre Eiweißabbau verantwortlich zu machen sein, die eine erhöhte Transpiration verursachen.

Das Anhalten der Erhöhung der Wärmeproduktion war abhängig von der verzehrten Futtermenge, und in der Regel nach 10 Stunden immer noch nachweisbar. Das Maximum der Wirkung erschien bei den von uns verabreichten Gaben 4 bis 6 Stunden nach der Fütterung. Bei der Fütterung nur sehr kleiner Mengen war die Wirkung innerhalb der ersten 10 Stunden abgeklungen.

*Magnus-Lévy* (31) findet das Maximum nach 3 bis 4 Stunden, wobei diese Intensität der Wirkung dann einige Stunden anhält, und ebenso wie wir, die Dauer der Wirkung von der verabreichten Eiweißmenge abhängig ist. Hingegen fand *Koraen* (32) an am Menschen ausgeführten Versuchen nach Darreichung von 250 g Eiweiß bereits nach 7 Stunden Nüchternwerte. Nach *Lusk* (33) erscheint das Maximum in der dritten Stunde, wobei dann diese Intensität 12 Stunden anhält und der Grundumsatz erst wieder nach 24 Stunden erhalten wird.

In bezug auf quantitatives Verhalten der spez.-dyn. Wirkung läßt sich schon aus der Tabelle IV und V ersehen, daß einer gefütterten größeren Eiweißmenge auch eine größere spez.-dyn. Wirkung entspricht. Es kommen zwar individuelle Abweichungen vor, wie bei Versuchs-

tier Nr. 2, bei dem die gleiche Eiweißmenge eine bedeutend größere spez.-dyn. Wirkung hervorrief. Zur besseren Übersicht dieser Verhältnisse haben wir die aus den durchgeführten Perioden für die direkte und indirekte Kalorimetrie erhaltenen Mittelwerte auf 24 Stunden und Quadratmeter Körperoberfläche berechnet und in Prozenten in der Tabelle VII zusammengestellt.

Tabelle VII.

Verzehrte Fleisch- (F) bzw. Eiklar-(E)Menge g	Deren Stickstoffgehalt g	Mittlere spez.-dyn. Wirkung		
		1. Hund	2. Hund	7. Hund
289,1 F	9,27		39,6	
263,2 F	8,52	21,2		
340,7 E	7,67			21,0
382,7 E	7,54		20,0	
152,8 F	5,04		17,8	
141,8 F	4,77	16,0		
223,6 E	4,51			21,2
212,4 E	4,40		14,7	
160,1 E	3,38			11,6
143,7 E	3,04		13,2	
82,2 F	2,73	9,5		
83,0 F	2,75		17,7	
88,9 E	1,97		10,5	
86,2 E	1,92			5,0
55,7 F	1,88	6,2		
53,6 F	1,79		9,8	

Die Tabelle zeigt deutlich die Abhängigkeit der Intensität der spez.-dyn. Wirkung von der gereichten auf N bezogenen Eiweißmenge.

g) Vergleich zwischen Wärmeproduktion und Sauerstoffverbrauch.

Wenn wir bei den einzelnen Versuchen die spez.-dyn. Wirkung der direkten und indirekten Kalorimetrie periodenweise vergleichen, so zeigen sich in den ersten Perioden höhere Werte bei der indirekten Kalorimetrie, wobei der Unterschied gegenüber der direkten 15 bis 20 % betragen kann. Umgekehrt wieder weisen die letzten Perioden wieder höhere Werte bei der direkten Kalorimetrie auf. Der Unterschied gleicht sich aber aus, wenn wir bei direkter und indirekter Kalorimetrie die Mittelwerte des ganzen Versuchs berücksichtigen. (In den Versuchen, wo nur zwei Perioden angegeben sind, muß natürlich auch hier eine Differenz auftreten. Um Mißverständnissen vorzubeugen, sei bemerkt, daß sich die Übereinstimmung zwischen direkter und indirekter Kalorimetrie in Tabelle II auf die Mittelwerte der ganzen Versuche bezog.)

Dieses unterschiedliche Verhalten der Wärmeproduktion zwischen direkter und indirekter Kalorimetrie wird sehr schön durch die kalori-

schen Werte (Quotient aus der Kalorienzahl und dem Sauerstoffverbrauch), die in den Generaltabellen angeführt sind, demonstriert. Es stimmen hierbei nicht nur die kalorischen Werte aus den beiden Normalperioden, wie zu erwarten war, ein und desselben Versuchs überein, sondern auch *die* sämtlicher Versuche. Die erhaltenen kalorischen Werte in diesen Normalperioden schwanken zwischen  $\pm 2$  bis  $3\%$ , nur ausnahmsweise zwischen  $\pm 5\%$ , und entsprechen jenen, die von *Magnus-Lévy* (34) angegeben wurden. Anders liegen jedoch die Verhältnisse bei den folgenden Fütterungsperioden. Wenn nun oben mitgeteilt wurde, daß in der ersten Fütterungsperiode die Werte aus der indirekten Kalorimetrie jene der direkten übersteigen, so müssen in diesen Perioden die Cal/O<sub>2</sub>-Werte sinken, und umgekehrt in den letzten Perioden, wo die direkte Kalorimetrie höhere Werte ergab als die indirekte, steigen. Diese Erwartungen werden durch die erhaltenen kalorischen Werte erfüllt. In 13 von 16 Versuchen war der kalorische Wert in der ersten Fütterungsperiode gegenüber den Normalperioden deutlich gesunken, und viel kleiner, als dem respiratorischen Quotienten entsprechen würde. So betragen die kalorischen Werte in Versuch 28 4,10 (R.Q. = 0,785), in Versuch 30 3,96 (R.Q. = 0,731), in Versuch 40 4,04 (R.Q. = 0,740) und in Versuch 47 4,18 (R.Q. = 0,712). Hingegen war der kalorische Wert in 11 Versuchen in der dritten, vierten oder fünften Fütterungsperiode größer als dem R.Q. entsprechen würde. So beträgt er in Versuch 30 5,37 (R.Q. = 0,850), in Versuch 36 5,01 (R.Q. = 0,774), in Versuch 38 5,14 (R.Q. = 0,775), in Versuch 52 5,22 (R.Q. = 0,849) usw. Wenn wir aber aus den kalorischen Werten sämtlicher Fütterungsperioden den Mittelwert ziehen, so erhalten wir wieder einen Wert, der dem des R.Q. entspricht.

*Williams, Rich* und *Lusk* (35) fanden ebenfalls einen Unterschied zwischen direkter und indirekter Kalorimetrie. Die Autoren berechneten die indirekte Kalorimetrie aus N- und C-Gehalt der Körperabgaben und fanden, daß diese in der zweiten bis dritten Stunde der Nahrungsaufnahme größer ist, als die direkte. Sie nahmen an, daß der Unterschied zwischen direkter und indirekter Kalorimetrie von einer größeren Durchwärmung der Körperoberfläche herrührt und aus diesem Grunde die im Mastdarm gemessene Temperatur kein Maß der Temperaturerhöhung des Hundes darstellt. In späteren Versuchen erklärte *Lusk* (36) diese Erscheinung mit der tieferen Temperatur der verabreichten Nahrung gegenüber der Körpertemperatur, so daß die aufgenommene Nahrung dem Körper Wärme entziehen muß, die sich dann in der zweiten bis dritten Stunde in der beschriebenen Weise äußert. *Lusk* fand nämlich dann keinen Unterschied zwischen direkter und indirekter Kalorimetrie, wenn er die zu verabreichende Nahrung vorher auf Körpertemperatur brachte. (Diese Versuche führte der Autor mit Zuckerlösungen aus, und wenn er diese vorher nicht auf Körpertemperatur erwärmte, erhielt er für die indirekte Kalorimetrie in der angegebenen Zeit um 6 bis 7% größere Werte.)

Bei unseren Versuchen hatte die verabreichte Nahrung Kalorimeter-temperatur (26 bis 27°), doch zeigte sich zwischen direkter und indirekter Kalorimetrie ein viel größerer Unterschied als der *Lusks*, so daß uns dessen Erklärungsweise nicht befriedigend erscheint und uns nach einer anderen Ursache suchen ließ, um so mehr, als bei unseren Versuchen die indirekte Kalorimetrie durch den Sauerstoffverbrauch repräsentiert wird.

In der Restitutionsperiode der Muskelkontraktionen ist der Sauerstoffverbrauch, wie bekannt, erhöht, und parallelgehend ist auch eine Erhöhung der Wärmeproduktion anzunehmen. Wenn wir aber nicht nur *eine* Muskelfaser berücksichtigen, sondern die gesamte arbeitende Muskulatur eines Körpers, dann muß die Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs infolge des raschen Blutkreislaufes und des raschen Gaswechsels sofort bemerkbar sein, was wir mit derartigen Versuchen auch bestätigen können. Hingegen braucht die mit dem erhöhten Sauerstoffverbrauch eintretende erhöhte Wärmeproduktion mit dem Oxydationsprozeß nicht gleichzeitig verlaufend in Erscheinung zu treten, da die Wärmeproduktion in der Regel nach der Wärmeabgabe gemessen wird. Die Wärmeentstehung und damit eine erhöhte Wärmeproduktion geht aber im Körperinnern vor sich, während die Wärmeabgabe an die Körperoberfläche gebunden ist. Wenn dem so ist, dann ist auch erklärlich, warum die im Innern des Körpers angereicherte Wärme sich bei unseren ersten Fütterungsperioden nicht bemerkbar macht, sondern erst in den letzten, da eben mit Hilfe unserer Vorrichtungen nur die Wärmeabgabe gemessen wird.

Man hätte daran denken können, daß dieses Defizit in der direkten Kalorimetrie auf die Trägheit des Apparates zurückzuführen sei, in dem Sinne, daß der Apparat verspätet die Erhöhung der Wärmeabgabe registriert. Dieser Einwand aber wird sofort hinfällig, wenn wir auch die Wasserabgabe in den Gesichtskreis unserer Betrachtungen ziehen, die doch von der die Wärmestrahlung registrierenden Apparatur unabhängig ist. Ein Blick auf die entsprechende Kolonne in Tabelle IV zeigt bei Versuch 30 in der ersten Fütterungsperiode nach Fleischfütterung eine Wärmeproduktion der indirekten Kalorimetrie bereits von 812 Cal, gegenüber 686 Cal der direkten Kalorimetrie, bei welcher letzterer sich also beim Vergleich mit dem Grundumsatz kaum ein Unterschied ergab. Zur selben Zeit zeigte sich auch kaum noch eine Erhöhung der Wasserabgabe. Diese Zahlen weisen wohl darauf hin, daß die Wärmeabgabe gegenüber der gesteigerten Oxydation verschoben ist<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Wenn z. B. die strahlende Wärme des Wärmeplus verspätet in Erscheinung treten würde, die Wasserabgabe aber keine Verspätung zeigen würde, so würde das weder für, noch gegen eine zu große Trägheit des



Trotzdem kann man nicht behaupten, daß der Energieumsatz durch die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs besser charakterisiert ist, als durch die Wärmeabgabe, oder umgekehrt. Die Oxydation der Moleküle erfolgt nicht momentan wie in der *Berthelotschen Bombe*, sondern mit unbekannter, doch jedenfalls beschränkter Geschwindigkeit bis zu den Endprodukten. Andererseits erfolgt auch die Umwandlung der chemischen Energie in Wärme nicht auf einmal, sondern etappenweise nach Maßgabe der stofflichen Umwandlungen. Es besteht durchaus kein strenger Parallelismus zwischen Sauerstoffaufnahme und Wärmeabgabe der zu oxydierenden Substanz unter Umwandlung ihrer chemischen Energie in Wärme, um so weniger, da ja Verbrauch von Sauerstoff durch unsere Methodik schon zu einer Zeit angezeigt werden kann, in der die gebildete Wärme noch nicht an die Oberfläche gelangt ist und abgegeben wurde.

*h) Beteiligung der Wasserverdampfung an der Wärmeabgabe.*

Aus Tabelle VIII ist ersichtlich, daß in den Normalperioden der Anteil der Wasserverdunstung an der Wärmeabgabe ziemlich konstant ist, nur geringe individuelle Schwankungen zeigt und etwa 17 bis 20 % beträgt. (Bei Tier Nr. 2 sind die Werte z. B. dauernd etwas niedriger als bei den beiden anderen Versuchstieren.) In den Fütterungsperioden sowohl nach Fleisch als auch nach Eiklarverabreichung ist die Wärmeabgabe durch Wasserverdunstung bedeutend stärker als durch Strahlung und Leitung. Unter den beiden verabreichten Nahrungsmitteln bewirkt wiederum Eiklar eine höhere Wärmeabgabe durch Wasserverdunstung als Fleisch. Diese Erscheinung kann vielleicht mit der im Eiklar vorhandenen größeren Flüssigkeitsmenge in Zusammenhang gebracht werden. Nach Fleischfütterung sieht man zwar sofort eine geringe Erhöhung der Wasserabgabe, doch werden die maximalen Werte erst 5 bis 6 Stunden nach der Fütterung erreicht (Versuch 28, 29, 30 und 36). Nach Verfütterung von Eiklar tritt diese Steigerung in der Wasserverdunstung sofort ein und hält bei größeren Mengen 6 bis 8 Stunden an, zeigt aber nach kleineren Mengen bereits nach 3 bis 4 Stunden eine sinkende Tendenz.

*i) Respiratorischer Quotient.*

Die von uns in den Normalperioden gefundenen R.Q. bewegen sich im Mittel um 0,740. Nach Fleischfütterung steigt der R.Q. bereits in den ersten beiden Stunden, erreicht das Maximum nach 6 bis 8 Stunden,

---

Apparates sprechen. Auch wenn die Registrierung der Strahlungswärme eine wesentliche Steigerung zeigt, so könnte das auch noch auf eine zu große Trägheit des Apparates zurückzuführen sein. Gegen eine solche aber sprechen die vorliegenden Befunde in der Wasserabgabe.

Tabelle VIII.

Nr. von Versuch und Tier	Versuchsperiode	Von der auf 24 Stunden berechneten Wärmeabgabe bei den Fleischversuchen entfallen auf			
		Strahlung und Leitung Cal	Wasser- verdampfung Cal	Strahlung und Leitung o/o	Wasser- verdampfung o/o
28 2	I. N. P.	261,4	45,5	85	15
	II. "	268,4	55,3	83	17
	I. F. P.	244,5	80,2	79	21
	II. "	341,4	118,4	74	26
	III. "	342,4	108,5	76	24
29 1	I. N. P.	307,8	73,6	81	19
	II. "	314,8	73,7	81	19
	I. F. P.	335,5	106,9	76	24
	II. "	341,7	104,5	77	23
	III. "	350,9	133,5	72	28
	IV. "	356,5	169,1	68	32
30 2	V. "	358,0	136,0	72	28
	I. N. P.	258,3	57,1	82	18
	II. "	256,0	52,0	83	17
	I. F. P.	270,9	62,7	81	19
	II. "	305,5	85,1	78	22
	III. "	291,8	103,1	74	26
31 1	IV. "	274,0	93,8	75	25
	V. "	280,2	101,2	74	26
	I. N. P.	303,8	71,4	81	19
	II. "	307,3	83,8	79	21
	I. F. P.	330,9	133,4	71	29
	II. "	344,7	145,5	70	30
33 1	I. N. P.	328,3	84,8	80	20
	II. "	331,5	84,3	80	20
	I. F. P.	343,4	96,1	78	22
	II. "	349,7	100,1	78	22
	III. "	363,8	108,4	77	23
36 2	I. N. P.	252,2	42,1	86	14
	II. "	259,6	43,3	86	14
	I. F. P.	270,2	53,8	83	17
	II. "	290,1	67,5	81	19
	III. "	303,1	78,1	79	21
	IV. "	264,6	89,2	75	25
38 1	V. "	275,4	88,5	76	24
	I. N. P.	355,6	80,8	82	18
	II. "	362,7	77,0	83	17
	I. F. P.	363,9	90,9	80	20
	II. "	369,0	103,1	78	22
	III. "	374,4	99,9	79	21
40 2	IV. "	367,0	112,1	77	23
	V. "	369,5	102,0	78	22
	I. N. P.	266,9	39,8	87	13
	II. "	281,8	53,7	84	16
	I. F. P.	296,3	58,3	84	16
	II. "	303,5	59,0	84	16
	III. "	301,4	54,6	85	15

N. P. = Normalperiode. F. P. = Fütterungsperiode.

Tabelle VIII (Fortsetzung).

Nr. von Versuch und Tier	Versuchsperiode	Von der auf 24 Stunden berechneten Wärmeabgabe bei den Eiklarversuchen entfallen auf			
		Strahlung und Leitung Cal	Wasser- verdampfung Cal	Strahlung und Leitung %	Wasser- verdampfung %
42 7	I. N. P.	335,0	77,9	81	19
	II. "	329,9	73,8	82	18
	I. F. P.	329,1	109,7	75	25
	II. "	341,5	134,3	72	28
	III. "	347,2	149,9	70	30
44 2	IV. "	347,1	190,3	65	35
	V. "	340,5	108,7	76	24
	I. N. P.	281,7	51,9	85	15
	II. "	300,5	59,8	83	17
	I. F. P.	284,2	102,7	73	27
45 7	II. "	303,5	108,2	74	26
	III. "	328,1	119,0	73	27
	IV. "	334,2	109,3	75	25
	V. "	332,5	82,3	80	20
	I. N. P.	329,5	75,6	81	19
46 2	II. "	340,8	73,8	82	18
	I. F. P.	322,6	197,4	62	38
	II. "	332,5	143,7	70	30
	I. N. P.	285,9	55,2	84	16
	II. "	292,1	59,0	83	17
47 7	I. F. P.	266,0	115,2	70	30
	II. "	288,6	86,4	77	23
	III. "	290,3	80,8	78	22
	IV. "	319,2	83,4	79	21
	V. "	324,4	73,9	78	22
52 2	I. N. P.	329,2	71,3	82	18
	II. "	341,6	72,9	83	17
	I. F. P.	329,5	129,8	72	28
	II. "	334,0	127,3	72	28
	III. "	337,7	129,2	72	28
50 7	IV. "	342,4	97,9	78	22
	V. "	331,5	94,2	78	22
	I. N. P.	262,3	74,1	78	22
	II. "	274,0	86,0	76	24
	I. F. P.	275,0	89,3	75	25
50 7	II. "	294,8	104,3	74	26
	III. "	300,3	101,8	75	25
	IV. "	310,7	103,9	75	25
	I. N. P.	343,6	90,6	79	21
	II. "	337,5	—	—	—
50 7	I. F. P.	333,5	136,5	71	29
	II. "	348,0	161,0	68	32
	III. "	341,5	150,2	69	31
	IV. "	337,3	154,4	69	31
	V. "	312,8	121,4	72	28

N. P. = Normalperiode. F. P. = Fütterungsperiode.

Tabelle VIII (Fortsetzung).

Nr. von Versuch und Tier	Versuchsperiode	Von der auf 24 Stunden berechneten Wärmeabgabe bei den Eiklarversuchen entfallen auf			
		Strahlung und Leitung Cal	Wasser- verdampfung Cal	Strahlung und Leitung %	Wasser- verdampfung %
54 2	I. N. P.	285,6	57,1	83	17
	II. "	286,1	57,0	83	17
	I. F. P.	266,4	117,4	70	30
	II. "	269,0	101,4	73	27
	III. "	270,2	88,3	75	25
	IV. "	274,4	76,4	78	22
	V. "	275,0	70,5	80	20

N. P. = Normalperiode. F. P. = Fütterungsperiode.

sinkt hierauf wieder und erreicht seinen normalen Wert nur in zwei von unseren Versuchen, und zwar erst in der zehnten Stunde. Nach Verfütterung von Eiklar konnten wir in der ersten Fütterungsperiode, mit Ausnahme des Versuchs 44, kein Ansteigen des R.Q. beobachten. Er sinkt sogar in vier von acht Versuchen, während in den übrigen gegenüber den Normalperioden kaum eine Änderung zu bemerken ist. Die Steigerung tritt dann bald ein und erreicht auch schon bei vier Versuchen (44, 46, 47 und 52) in der vierten Stunde das Maximum, bei den anderen Versuchen aber erst in der achten bis zehnten Stunde. In den Fleischfütterungsperioden zeigt der R.Q. sehr hohe Werte, die auch jene überschreiten, die man sonst bei Verfütterung von Eiweiß zu beobachten pflegt (Versuch 29, R.Q. = 0,849, Versuch 29, R.Q. = 0,886, Versuch 31, R.Q. = 0,932). Diese Erscheinung kann vielleicht in Zusammenhang mit einem höheren Glykogengehalt (Pferdefleisch) gebracht werden. Bei den Eiklarfütterungsversuchen konnten wir keine so hohen R.Q. erhalten. Diese bewegen sich in der Höhe jener, die für die Verfütterung von Eiweiß gelten.

#### Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die Steigerung in der Wärmeproduktion erklärt *Zuntz* mit der Ernährung und Verdauungsarbeit (Kauen, Schlucken, Weiterbeförderung der Nahrung, Verdauungssaftsekretion, Resorption usw.). Nach *Rubner* übt die eingeführte Nahrung bzw. deren Spaltprodukte auf die Zellen einen Reiz aus, in dessen Folge der Stoffwechsel erhöht wird. *Lusk* bewies dann, daß diese Spaltprodukte in den Aminosäuren zu erblicken seien. Daß die Verdauungsarbeit die Ursache der Wärmesteigerung sei, bezweifelten *Rapport* und *Lusk* (37), die zeigten, daß noch 14 Stunden nach Eiweißfütterung eine Erhöhung im Stoffwechsel nachweisbar ist, zu einer Zeit also, in welcher schon drei Viertel des N der eingeführten Nahrung ausgeschieden war. *Benedict* (38) brachte auch wichtige Beweisgründe gegen die Auffassung von *Zuntz* bei Versuchen vor, die er mit Agar-Agar ausgeführt hatte.

*Lusk* und seiner Schule gelang es demnach, *Rubners* Theorie durch den Nachweis zu bestätigen, daß Aminosäuren ebenso wie Eiweiß eine Wärmesteigerung verursachen. Diesen Angaben gegenüber aber muß die Tatsache auffallend erscheinen, daß nach Verfütterung von Eiweiß immer eine hohe Steigerung der Wärmeproduktion eintritt, während nach der Fütterung von Fett, das doch beinahe die doppelte Kalorienmenge bei seiner Verbrennung entwickeln kann, eine Wärmesteigerung nur in geringem Maße oder, wie manche Autoren angeben, überhaupt nicht beobachtet wird.

So nimmt *Scheuer* (39) eine Anhäufung von Fett bzw. Glykogen im Körper an, ohne daß sich der Stoffwechsel hierbei erhöht, sobald dem Körper N-freie Nahrungsstoffe im Überschuß zugeführt werden. *Benedict* (40) findet nach Kohlenhydratfütterung eine große Erhöhung der Wärmeproduktion, wenn keine Reserven im Organismus vorhanden sind. *Mason* (41) findet nach Fettzufuhr bei Unterernährten eine viel größere Erhöhung im Stoffwechsel, als bei diesen Personen später im wohlernährten Zustande nach einer Mastkur. *Bruin* (42) findet bei dicken Kindern mit normalem Grundumsatz eine geringere spez.-dyn. Wirkung. Nach *Carpenter* und *Fox* (43) ist kein Zusammenhang zwischen spez.-dyn. Wirkung und verbrannter Zuckermenge nachweisbar. *Baur* (44) fand bei einer Person, die durch mehrtägiges Hungern absichtlich glykogenfrei gemacht worden war, einen sehr hohen Sauerstoffverbrauch nach Traubenzucker verabreichung und nimmt aus diesem Grunde an, daß eine länger dauernde Überernährung die spez.-dyn. Wirkung herabsetzt. *Dann* und *Chambers* (45) geben ebenfalls eine sehr hohe spez.-dyn. Wirkung bei Hunden an, die 3 Wochen hindurch hungerten. *Mac Clellan* (46) schließlich behauptet, daß die Extrawärmeerzeugung größer ist, wenn die Verabreichung der Kohlenhydrate eingeschränkt wird und vorher mehr von ihnen gegeben wurde.

Diese Literaturangaben scheinen uns auf einen Zusammenhang zwischen der spez.-dyn. Wirkung N-freier Stoffe und dem Vorhandensein oder Fehlen einer Reserve dieser Stoffe in dem Sinne hinzuweisen, daß ein Organismus aufgenommene N-freie Substanzen wie Fette und Kohlenhydrate verbrennt oder deponiert, je nachdem wieviel in seinem Körper von den verabreichten Substanzen vorhanden ist. Stehen dem Körper große Reserven zur Verfügung, dann verbrennt er nicht sofort die frisch einverleibten, sondern zuerst die in den Depots (Fettdepot, Leber) aufgestapelten und für die Verbrennung schon vorbereiteten Stoffe. Besitzt der Körper hingegen keine Reservestoffe, dann verbrennt der Organismus die frisch zugeführten Fette und Kohlenhydrate sofort, was sich in einer starken Steigerung der Wärmeproduktion äußert. Da die Fettreserven größer als die Glykogenreserven sind, muß die spez.-dyn. Wirkung der Fette kleiner sein als die der Kohlenhydrate.

Ganz anders hingegen verhält sich der Organismus gegenüber Eiweißkörpern. Da bei normalen Verhältnissen der Körper kein Eiweiß ansetzt, so muß die vom Körper resorbierte Eiweißmenge sofort verbrannt werden. Bei Verabreichung von weniger Eiweiß muß daher die Wärmeproduktion geringer, bei größeren Eiweißgaben größer sein.

So konnte *Magnus-Lévy* (47) bereits bei an Hunden ausgeführten Versuchen beobachten, daß nach 400 g Fleisch eine Wärmesteigerung von

33% eintrat, die dann 60 bis 70% erreichte, wenn er eine Fleischmenge verfütterte, die 60 g N enthielt. („Je mehr das Futter Eiweiß enthält, um so größer ist die Steigerung und um so länger hält sie an.“) *Gigon* (48) arbeitete mit verschiedenen Caseinmengen und fand eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs von 6 bis 54%, entsprechend einer Caseinmenge von 40 bis 200 g. *William, Rich und Lusk* (49) sahen nach 700 g Fleisch 45%, nach 1200 g Fleisch 82% Wärmesteigerung, *Rapport und Weiss* (50) fanden entsprechend einer Fleischmenge von 200, 400 und 800 g, 29,8, 38,1, 51,2 und 59,5% Erhöhung in der Wärmeproduktion; *Hári* (51) fand ebenfalls die spez.-dyn. Wirkung proportional den verfütterten Eiweißmengen. Man kann die Angabe von *Rapport* (52) in Einklang mit jenen Versuchsreihen bringen, bei welchen er von verschiedenen Eiweißarten dieselben Mengen gab (entsprechend 6 g N) und fand, daß die spez.-dyn. Wirkung unabhängig von der Herkunft immer gleich war.

Absichtlich arbeiteten wir bei unseren Versuchen mit zwei verschiedenen Eiweißkörpern und auch verschiedenen Mengen. Hierbei beobachteten wir, daß die spez.-dyn. Wirkung nach den beiden verabreichten Eiweißkörpern mit deren N-Gehalt in Zusammenhang steht.

Für die von uns entwickelte Anschauung spricht auch die Angabe *Rubners* (53), der fand, daß abgelagertes Eiweiß keine spez.-dyn. Wirkung ausübt; desgleichen ist nach demselben Autor auch Eiweißansatz möglich, ohne jede energetische Veränderung.

Aus diesen Angaben der Literatur folgt, daß die Wärmeproduktion nach Eiweißfütterung *dann nur gering ist, wenn der Körper in der Lage ist, Eiweiß anzusetzen*. Zur allgemein angenommenen Ansicht der *Luskschen* Schule, daß die spez.-dyn. Wirkung der Eiweißkörper auf deren Aminosäuren zurückzuführen ist, stehen unsere Anschauungen *nicht* im Widerspruch, die dahin gehen, daß die nach Verbrennung von Eiweiß entstehende große und sofort eintretende Wärmesteigerung darauf zurückzuführen ist, daß der Körper kein Eiweiß deponieren kann, sondern dieses sofort verbrennt und entsprechend dieser Verbrennung, wie aus unseren Versuchen überzeugend hervorgeht, eine der verabreichten Eiweißmenge proportional gesteigerte Kalorienzahl produziert wird.

#### Zusammenfassung.

1. Die spez.-dyn. Wirkung von Eiweiß (Fleisch, Eiklar) ist von der verfütterten Eiweißmenge abhängig.
2. Diese Abhängigkeit der spez.-dyn. Wirkung von der verfütterten Eiweißmenge wurde mit dem Nichtansatz von Eiweiß im Organismus unter normalen Verhältnissen und dessen sofortiger Verbrennung in Zusammenhang gebracht.
3. Die Wärmeabgabe des Organismus wurde mit dem Sauerstoffverbrauch in den einzelnen Perioden nach der Eiweißverfütterung nicht synchron verlaufend gefunden und diese Erscheinung erklärt.

## Literatur.

- 1) Pflügers Arch. **55**, 1, 1894. — 2) Skand. Arch. **11**, 177, 1901. — 3) Gesetze S. 334, 1902. — 4) Pflügers Arch. **110**, 227, 1905. — 5) Zeitschr. f. Biol. **50**, 488, 1908. — 6) Pflügers Arch. **140**, 509, 1911. — 7) J. of biol. Chem. **12**, 347, 1912. — 8) Ebenda **13**, 27, 1912/13. — 9) Arch. f. intern. Med. **19**, 840, 1917. — 10) Diese Zeitschr. **156**, 318, 1915. — 11) J. of biol. Chem. **20**, 555, 1915. — 12) Ebenda **22**, 15, 1915. — 13) Food Ingest. and Energy Transformations 1918. — 14) J. of biol. Chem. **60**, 513, 1924. — 15) Ebenda **60**, 497, 1924. — 16) Amer. J. of Phys. **74**, 656, 1925. — 17) Diese Zeitschr. **173**, 26, 1926. — 18) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **164**, 202, 1929. — 19) J. of biol. Chem. **89**, 675, 1930. — 20) Zeitschr. z. Phys. d. Menschen bei Arbeit u. Sport **2**, 327, 1930. — 21) Diese Zeitschr. **230**, 187, 1920. — 22) J. Nutrit **2**, 389, 1929/30. — 23) l. c. 3. — 24) l. c. 20. — 25) Bull. N. Y. Acad. Med. ser. II, **2**, 502, 1925. — 26) l. c. 3. — 27) *Ascher-Spiro*, Ergebnisse **33**, 103, 1931. — 28) Diese Zeitschr. **250**, 326, 1932. — 29) l. c. 17. — 30) l. c. 13, S. 335. — 31) l. c. 1. — 32) l. c. 2. — 33) l. c. 11. — 34) *Noorden*, Pathol. d. Stoffwechsels **1**, 207, 1906. — 35) l. c. 7. — 36) l. c. 11. — 37) l. c. 7. — 38) l. c. 13. — 39) l. c. 4. — 40) l. c. 13, S. 248. — 41) J. of Klin. in West **4**, 353, 1928. — 42) Nederl. Tidschr. Geneesk. **2**, 4418, 1931. — 43) l. c. 22. — 44) l. c. 18. — 45) J. of Biochem. **89**, 675, 1930. — 46) Zitiert bei *G. Lusk*, *Ascher-Spiro*, Ergebnisse **33**, 115, 1932. — 47) l. c. 1. — 48) l. c. 6. — 49) l. c. 7. — 50) l. c. 14. — 51) l. c. 17. — 52) l. c. 15. — 53) l. c. 3.

## Tierische Kalorimetrie.

X. Mitteilung:

### Über die spezifisch-dynamische Wirkung der Fette.

Von

Zoltán Aszódi und Josef Pélyi.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der kgl. ung. Universität  
Budapest.)

(Eingegangen am 18. März 1934.)

In der vorangehenden Mitteilung (1), die sich mit der spez.-dyn. Wirkung der Eiweißstoffe befaßt, haben wir die im Verhältnis zur verabreichten Eiweißmenge proportional eintretende spez.-dyn. Wirkung auf die sofortige Verbrennung der Eiweißstoffe zurückgeführt, da letztere im normalen Organismus unter gewöhnlichen Umständen nicht angesetzt werden. Gleichzeitig haben wir auch die Vermutung geäußert, daß die anderen Nahrungsmittel, wie Fette und Kohlenhydrate, deswegen eine geringere und inkonstante spez.-dyn. Wirkung zeigen, weil der Organismus in der Lage ist, sie als Reservestoffe abzulagern, und sie daher nicht sofort verbrennen muß.

Bezüglich des Stoffwechsels des Hundes sagt *Pflüger* (2), daß dieser dann am kleinsten ist, wenn der Hund hungrig oder Fette oder Kohlenhydrate zu sich nimmt. *Magnus-Lévy* (3) findet beim Menschen nach Verabreichung größerer Mengen von Fett eine größere, bei kleineren Mengen eine kleinere Steigerung, doch finden sich bei ihm auch Versuche, bei welchen Fettverabreichung überhaupt keine Steigerung der Wärmeproduktion verursachte. *Rubner* (4) gibt als spez.-dyn. Wirkung der Fette eine Steigerung der Wärmeproduktion um 12,7% an. Nach ihm zeigen die Eiweißstoffe die größte spez.-dyn. Wirkung, dann folgen die Fette und zuletzt die Kohlenhydrate. *Lusk* bezweifelt diese Reihenfolge und erkennt den Kohlenhydraten eine größere spez.-dyn. Wirkung als den Fetten zu. Nach *Koraen* (5) kommt den Fetten keine spez.-dyn. Wirkung zu. *Schreuer* (6) sagt, daß eine Anhäufung von Fett bzw. Glykogen im Körper eintritt, wenn man N-freie Nahrung dem Körper im Überschuß zuführt, ohne daß sich hierbei der Stoffwechsel wesentlich erhöht. *Gigon* (7) fand nach Ölzufuhr eine Verminderung des Stoffwechsels, die erst nach einer Gabe von 150 g Öl in eine unwesentliche Steigerung überging. *Murlin* und *Lusk* (8) verabreichten Hunden 100 g Fett als Emulsion und beobachteten eine 30%ige Steigerung in der sechsten Stunde, und bei einem anderen Hunde nach 75 g eine 18%ige Steigerung, die mindestens 10 bis 12 Stunden andauerte. Nach *Benedict* (9) beträgt die spez.-dyn. Wirkung 12% und ist geringer als die der Kohlenhydrate.

Aus diesen Versuchsergebnissen der Literatur geht schon hervor, daß man aus ihnen eine einheitliche Vorstellung, wie aus den Versuchen mit Eiweißstoffen, nicht erhalten kann. Es hatte daher aus diesem



Versuch	Tier	Gewicht des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Temperatur des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Mittlere Temperatur des Tier- behälters	Datum	Sauerstoff- verbrauch	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	RQ.									
Nr.	Nr.	g	°C	°C		g	g	g										
66	2	8480,7 8419,0	38,2 38,1	22,8 24,0 24,3 24,8 24,9 25,2 25,5 25,6 25,7 25,9 25,4	1. IV. 1932	17,00 9,01 8,84 10,05 9,67 10,13 9,80 10,55 10,96 11,03 10,59	17,30 8,66 9,41 9,93 9,89 10,26 10,28 10,18 10,63 10,97 10,62	17,67 7,49 8,66 11,41 9,39 11,41 11,37 11,78 10,57 13,04 12,45	0,740 0,699 0,774 0,719 0,744 0,737 0,763 0,770 0,705 0,723 0,729									
					8 <sup>h</sup> —12 <sup>h</sup>													
					12—14													
					14—16													
					16—18													
					18—20													
					20—22													
					22—24													
					24—2													
					2—4													
					4—6													
					6—8													
					Zusammen: bestimmt					117,63								
					berechnet					119,65								
63	7	9931,7 9886,0	38,7 38,4	24,3 25,3 25,2 25,9 26,0 26,3 26,0 26,4	18. III. 1932	23,17 10,94 10,55 11,53 11,06 11,68 10,70 11,25	24,03 11,19 10,89 11,85 10,93 11,67 11,31 11,06	26,24 9,82 10,54 11,11 10,20 12,14 11,73 12,21	0,754 0,746 0,751 0,748 0,719 0,727 0,770 0,715									
					8 <sup>h</sup> —12 <sup>h</sup>													
					12—14													
					14—16													
					16—18													
					18—20													
					20—22													
					22—24													
					24—2													
					Zusammen: bestimmt					100,88								
					berechnet					101,65								
					65					7	10106,6 9998,2	38,6 38,8	23,6 24,2 24,7 25,0 25,1 24,9 24,8 25,0	29. III. 1932	25,52 10,85 10,76 12,04 12,47 11,49 11,71 11,00	25,84 11,41 11,02 12,08 12,55 11,79 12,03 11,36	27,00 10,58 9,57 12,38 19,29 15,98 16,08 13,37	0,737 0,765 0,745 0,730 0,731 0,746 0,747 0,751
														7 <sup>h</sup> 50'—11 <sup>h</sup> 50'				
														11 50—13 50				
13 50—15 50																		
15 50—17 50																		
17 50—19 50																		
19 50—21 50																		
21 50—23 50																		
23 50—1 50																		
Zusammen: bestimmt	105,84																	
berechnet	106,60																	
64	2	8615,6 8518,2	38,4 38,5	22,4 24,2 24,5 24,7 24,9 25,0 25,3 25,7 25,9		22. III. 1932	18,22 8,87 9,12 9,01 9,17 9,79 10,05 11,41 11,24	18,26 9,49 9,65 9,16 9,18 10,30 10,20 11,54 11,28	17,53 9,04 9,28 8,94 8,45 10,27 9,88 13,15 15,33					0,729 0,778 0,769 0,739 0,728 0,765 0,758 0,736 0,730				
						7 <sup>h</sup> 45'—11 <sup>h</sup> 45'												
						11 45—13 45												
					13 45—15 45													
					15 45—17 45													
					17 45—19 45													
					19 45—21 45													
					21 45—23 45													
					23 45—1 45													
					1 45—3 45													
					Zusammen: bestimmt	96,88												
					berechnet	98,16												

\* 1 = Absolute Ruhe. 2 = Vereinzelte Bewegungen. 3 = Wenige Bewegungen.

tabelle.

Wärmeabgabe pro 24 <sup>h</sup> durch			Korrekt. für die Wärme- produktion Cal	Wärme- produktion pro qm Körperober- fläche und 24 <sup>h</sup>		Cal O <sub>2</sub>	Bemerkung	Verhalten des Tieres*
Strah- lung Cal	Wasser- ver- dampfung Cal	Ventil Cal		be- stimmt Cal	be- rechnet Cal			
233,2	61,6	42,6	-3,6	718	738	4,67	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	1
230,1	52,3	50,2	-3,6	708	761	4,35	I. Normalperiode	1
229,8	60,4	55,2	-3,6	736	757	4,60	II. „	1
237,7	79,6	61,9	-2,4	811	849	4,47	I. Fütterungsperiode, 62,9 g Speck	1
243,4	65,5	63,0	-2,4	795	828	4,55	II. „	1
267,3	79,6	69,3	-2,4	891	859	4,86	III. „	1
264,8	79,4	75,6	-2,4	898	837	5,07	IV. „	1
271,4	82,2	75,3	-2,4	918	902	4,81	V. „	1
269,9	73,8	77,9	-2,4	902	924	4,56	VI. „	1
291,7	91,0	80,0	-2,4	991	931	4,97	VII. „	1
277,9	86,9	78,9	-2,4	950	896	4,96	VIII. „	1
303,4	91,5	41,4	-9,1	827	887	4,39	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2
297,1	68,5	43,5	-9,1	774	836	4,35	I. Normalperiode	1
286,6	73,6	47,7	-9,1	772	807	4,50	II. „	1
301,0	77,5	51,2	-7,4	817	882	4,36	I. Fütterungsperiode, 59,6 g Speck	2
293,8	71,2	52,3	-7,4	793	840	4,41	II. „	2
303,8	84,7	52,6	-7,4	839	888	4,42	III. „	1
293,1	81,9	57,7	-7,4	823	823	4,73	IV. „	1
313,7	85,2	56,9	-7,4	868	854	4,75	V. „	2
326,4	94,2	72,1	+2,7	950	963	4,62	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2
290,5	73,8	71,8	+2,7	841	825	4,82	I. Normalperiode	1
290,8	66,8	84,8	+2,7	853	814	4,93	II. „	1
309,5	86,4	83,5	+1,4	922	907	4,76	I. Fütterungsperiode, 48,3 g Speck	2
290,3	134,6	86,1	+1,4	982	942	4,88	II. „ (31,0 Harn)	3
279,3	111,5	84,1	+1,4	914	870	4,94	III. „	1
289,8	112,2	83,8	+1,4	934	886	4,96	IV. „	1
292,0	93,3	84,0	+1,4	902	834	5,09	V. „	1
235,2	61,2	42,7	+0,0	723	764	4,43	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	1
243,7	63,1	52,2	+0,0	765	753	4,82	I. Normalperiode	1
238,5	64,8	63,3	+0,0	782	773	4,79	II. „	1
241,0	62,4	65,3	-0,4	786	763	4,87	I. Fütterungsperiode, 47,4 g Speck	1
248,6	59,0	69,1	-0,4	802	768	4,89	II. „	1
255,4	71,7	72,0	-0,4	850	829	4,85	III. „	1
267,9	69,0	79,1	-0,4	886	844	4,93	IV. „	1
280,7	91,8	82,8	-0,4	969	958	4,75	V. „ (42,4 g Harn)	1
277,1	107,0	88,5	-0,4	1007	942	5,00	VI. „	1

4 = Ziemlich ruhig. 5 = Unruhig.

Versuch	Tier	Gewicht des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Temperatur des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Mittlere Temperatur des Tierbehälters	Datum	Sauerstoffverbrauch	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	RQ.														
Nr.	Nr.	g	°C	°C		g	g	g															
107	7	10460,8 10335,2	38,6 38,8	25,7 26,1 26,3 26,5 26,9 26,5 26,8 26,7	28. IV. 1933	29,72 12,04 12,04 12,77 13,40 12,22 12,94 11,52	30,87 11,83 11,49 13,67 13,34 12,98 12,66 11,21	37,41 10,31 10,09 12,66 19,69 13,25 14,06 11,62	0,755 0,715 0,694 0,739 0,724 0,771 0,712 0,706														
					6 <sup>h</sup> 30'—10 <sup>h</sup> 30'																		
										Zusammen: bestimmt	116,65												
										berechnet	120,56												
		61	7		10519,8 10295,5					38,9 38,9	23,6 24,6 25,0 25,5 25,3 25,2 25,1 25,1	7. III. 1932	25,40 12,17 12,31 13,16 12,37 12,63 11,56 12,61	25,82 12,06 12,17 13,60 12,40 13,30 11,83 12,16	37,70 16,74 17,72 22,83 18,35 19,60 19,44 15,57	0,739 0,721 0,719 0,752 0,735 0,766 0,760 0,701							
												8 <sup>h</sup> 10'—12 <sup>h</sup> 10'											
										Zusammen: bestimmt		112,21											
										berechnet		112,13											
					74					2		8685,2 8642,6					38,5 38,5	24,5 24,7 24,9 25,4 25,4 25,4 25,2 25,3 25,2	18. XI. 1932	17,46 8,56 8,68 10,25 9,51 8,89 8,41 9,25 9,51	17,21 8,23 8,91 10,12 9,54 8,64 8,54 9,42 9,08	17,04 6,97 8,10 10,13 9,06 7,80 6,53 9,62 7,60	0,717 0,697 0,746 0,718 0,730 0,707 0,733 0,741 0,695
																			7 <sup>h</sup> 30'—11 <sup>h</sup> 30'				
																	Zusammen: bestimmt		90,52				
						berechnet	89,52																
103	13			9114,0 8983,5		37,9 38,1	23,0 23,7 23,8 25,1 25,5 25,6 25,4 25,2	11. IV. 1933	19,24 19,24 9,94 8,96 11,68 11,81 10,31 11,05 9,69			19,31 10,15 9,25 11,55 11,80 10,72 11,42 10,13					21,50 9,89 8,68 11,35 10,97 11,29 11,20 13,85		0,729 0,753 0,750 0,719 0,727 0,756 0,752 0,760				
								6 <sup>h</sup> 45'—10 <sup>h</sup> 45'															
								berechnet			95,06												

\* 1 = Absolute Ruhe. 2 = Vereinzeltte Bewegungen. 3 = Wenige Bewegungen.

(Fortsetzung).

Wärmeabgabe pro 24 <sup>h</sup> durch			Korrekt. für die Wärme- produktion	Wärme- produktion pro qm Körperober- fläche und 24 <sup>h</sup>		Cal O <sub>2</sub>	Bemerkung	Verhalten des Tieres*	
Strah- lung	Wasser- ver- dampfung	Ventil		Cal	be-				
					stimmt				rechnet
Cal	Cal	Cal	Cal	Cal	Cal				
348,1	130,5	53,9	+2,8	1003	1102	4,29	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2	
331,8	72,0	62,9	+2,8	883	906	4,64	I. Normalperiode	2	
328,7	70,4	56,5	+2,8	859	906	4,54	II. „	2	
325,1	88,4	71,4	+1,9	912	965	4,54	I. Fütterungsperiode, 42,7 g Speck	2	
321,8	137,4	67,2	+1,9	990	1009	4,70	II. „ (41,7 g Harn)	2	
310,5	92,5	73,6	+1,9	897	932	4,66	III. „	1	
325,7	98,1	64,9	+1,9	920	974	4,52	IV. „	2	
312,9	81,0	78,4	+1,9	889	871	4,90	V. „	1	
289,7	131,5	40,5	-4,2	857	935	4,29	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2	
292,5	116,8	39,5	-4,2	833	894	4,35	I. Normalperiode	1	
297,2	123,6	54,9	-4,2	883	904	4,56	II. „	2	
305,8	159,3	43,5	-2,9	947	974	4,58	I. Fütterungsperiode, 41,0 g Speck	2	
295,9	128,0	53,5	-2,9	889	901	4,61	II. „ (95,2 g Harn)	1	
304,7	136,8	42,7	-2,9	901	939	4,54	III. „	1	
294,7	135,7	53,2	-2,9	901	858	4,95	IV. „	1	
296,9	108,7	43,6	-2,9	836	927	4,21	V. „	1	
235,8	59,5	37,5	-1,1	702	723	4,54	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	1	
227,9	48,6	48,9	-1,1	686	711	4,51	I. Normalperiode	1	
229,1	56,5	53,1	-1,1	715	725	4,63	II. „	1	
245,3	70,7	54,0	-1,1	781	851	4,29	I. Fütterungsperiode, 40,4 g Speck	1	
234,4	63,2	61,8	-1,1	758	792	4,49	II. „	2	
241,6	54,4	66,1	-1,1	764	738	4,84	III. „	1	
234,5	45,6	62,6	-1,1	723	701	4,84	IV. „	1	
245,0	67,1	64,5	-1,1	795	772	4,84	V. „	1	
236,4	53,0	63,7	-1,1	746	790	4,41	VI. „	1	
256,4	75,0	39,8	+1,9	767	779	4,61	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2	
258,0	69,0	47,2	+1,9	773	808	4,51	I. Normalperiode	2	
256,0	60,6	45,2	+1,9	748	828	4,83	II. „	2	
290,3	79,2	50,2	+1,4	866	942	4,29	I. Fütterungsperiode, 31,5 g Speck	3	
290,9	76,6	53,1	+1,4	868	955	4,26	II. „	3	
287,1	78,8	53,5	+1,4	865	839	4,86	III. „	2	
291,7	78,2	56,3	+1,4	879	898	4,61	IV. „	2	
263,0	96,6	57,3	+1,4	860	790	5,14	V. „ (64,0 g Harn)	2	

4 = Ziemlich ruhig. 5 = Unruhig.

Versuch	Tier	Gewicht des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Temperatur des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Mittlere Temperatur des Tierbehälters	Datum	Sauerstoffverbrauch	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	RQ.													
Nr.	Nr.	g	°C	°C		g	g	g														
95	2	8219,7 8140,0	38,3 38,1	23,7 24,3 24,6 24,9 25,1 25,3 25,4 25,9 25,8	10. III. 1933					16,74 7,30 7,30 8,19 7,78 8,30 7,93 8,74 9,11 7,34 9,11 7,75 8,06 8,06 10,47 10,57 7,71 8,88	16,86 7,30 6,35 5,98 7,25 7,93 7,25 7,75 7,97 7,97 10,80 10,80 9,72	0,732 0,727 0,692 0,695 0,761 0,798 0,675 0,734 0,743										
					7 <sup>h</sup> —11 <sup>h</sup>																	
					11—13																	
					13—15																	
					15—17																	
					17—19																	
					19—21																	
					21—23																	
					23—1																	
					1—3																	
					Zusammen: bestimmt																	
					berechnet																	
					97	7	10687,4 10622,7	38,7 38,7	25,3 25,7 26,2 26,9 27,1 27,1 26,8 25,7				17. III. 1933					25,80 11,07 11,07 12,49 11,48 11,06 11,21 10,71	25,37 10,94 10,71 11,78 11,92 10,99 10,48 11,17	28,25 8,43 8,34 12,08 9,41 9,91 10,70 10,24	0,715 0,719 0,704 0,686 0,756 0,723 0,745 0,758	
7 <sup>h</sup> —11 <sup>h</sup>																						
11—13																						
13—15																						
15—17																						
17—19																						
19—21																						
21—23																						
23—1																						
Zusammen: bestimmt																						
berechnet																						
76	7	10385,0 10291,0	38,6 38,7	27,4 26,6 26,2 27,3 27,1 27,0 27,2 27,2 26,9						25. XI. 1932					28,10 12,37 11,56 14,01 13,23 13,40 12,92 13,71 13,02	28,02 12,85 11,43 13,64 12,81 13,95 12,91 12,99 12,70	29,68 10,33 10,10 11,85 12,27 12,35 12,68 12,97 12,46					0,725 0,756 0,719 0,708 0,704 0,757 0,727 0,689 0,710
										7 <sup>h</sup> 30'—11 <sup>h</sup> 30'												
					11 30—13 30																	
					13 30—15 30																	
					15 30—17 30																	
					17 30—19 30																	
					19 30—21 30																	
					21 30—23 30																	
					23 30—1 30																	
					1 30—3 30																	
					Zusammen: bestimmt																	
					berechnet																	
					98	13	9411,8 9258,0	38,3 38,3	23,6 24,1 24,7 25,2 25,3 25,3 25,4 25,3	21. III. 1933								21,10 9,83 10,70 11,99 11,40 11,99 11,44 9,90	21,65 9,98 10,53 11,17 11,34 11,46 11,57 10,06	22,55 9,90 10,43 11,54 11,48 14,98 16,66 15,39	0,746 0,729 0,716 0,678 0,724 0,695 0,736 0,739	
7 <sup>h</sup> —11 <sup>h</sup>																						
11—13																						
13—15																						
15—17																						
17—19																						
19—21																						
21—23																						
23—1																						
Zusammen: bestimmt																						
berechnet																						

\* 1 = Absolute Ruhe. 2 = Vereinzelte Bewegungen. 3 = Wenige Bewegungen.

(Fortsetzung).

Wärmeabgabe pro 24 <sup>h</sup> durch			Korrekt. für die Wärme- produktion	Wärme- produktion pro qm Körperober- fläche und 24 <sup>h</sup>		Cal O <sub>2</sub>	Bemerkung	Verhalten des Tieres*
Strahl- lung	Wasser- ver- dampfung	Ventil		Cal	Cal			
Cal	Cal	Cal				be- stimmt	be- rechnet	
239,8	58,6	31,5	-5,6	713	724	4,61	Vorperiode nach 48 <sup>h</sup> Fasten	2
225,0	44,3	36,5	-5,6	660	629	4,91	I. Normalperiode	1
222,8	41,7	43,2	-5,6	664	707	4,39	II. „	2
226,5	50,6	43,9	-4,1	696	716	4,55	I. Fütterungsperiode, 31,3 g Speck	2
233,0	51,2	42,4	-4,1	709	762	4,39	II. „	1
238,0	54,1	47,9	-4,1	739	839	4,20	III. „	2
236,2	55,7	47,8	-4,1	738	750	4,60	IV. „	2
268,5	75,4	52,0	-4,1	862	906	4,46	V. „ (31,9 g Harn)	3
218,5	67,8	50,4	-4,1	732	669	5,14	VI. „	1
324,9	98,6	49,4	-1,4	875	934	4,38	Vorperiode nach 48 <sup>h</sup> Fasten	2
310,8	58,8	55,5	-1,4	781	828	4,56	I. Normalperiode	2
305,1	58,2	52,7	-1,4	765	775	4,46	II. „	2
308,6	84,3	63,4	-1,3	839	904	4,30	I. Fütterungsperiode, 30,6g Speck	2
310,6	62,8	59,7	-1,3	796	838	4,48	II. „	2
306,8	69,2	66,0	-1,3	813	800	4,71	III. „	2
316,9	74,7	56,6	-1,3	824	816	4,75	IV. „	2
296,7	71,5	65,5	-1,3	797	782	4,81	V. „	2
323,1	103,5	69,4	+1,1	935	1038	4,21	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2
307,0	72,1	80,6	+1,1	867	921	4,44	I. Normalperiode	2
306,7	70,5	79,4	+1,1	861	853	4,72	II. „	3
319,0	82,7	75,1	+0,3	897	1034	4,06	I. Fütterungsperiode, 30,7 g Speck	3
327,5	85,6	80,6	+0,3	929	977	4,45	II. „	2
326,8	86,2	85,9	+0,3	939	988	4,44	III. „	3
334,6	88,5	83,2	+0,3	953	955	4,67	IV. „	2
327,8	90,5	87,5	+0,3	952	1012	4,40	V. „	3
329,1	86,9	83,5	+0,3	938	961	4,57	VI. „	2
296,0	78,7	37,3	-2,9	824	839	4,62	Vorperiode nach 24 <sup>h</sup> Fasten	2
285,9	69,1	49,3	-2,9	809	778	4,86	I. Normalperiode	1
297,2	72,8	51,0	-2,9	842	846	4,65	II. „	2
295,9	80,5	53,3	-2,6	860	948	4,24	I. Fütterungsperiode, 30,2 g Speck	3
303,2	80,1	49,9	-2,6	867	901	4,50	II. „	2
287,2	104,5	61,9	-2,6	908	948	4,48	III. „ (69,3 g Harn)	3
292,8	116,2	57,0	-2,6	934	907	4,82	IV. „	3
283,4	107,4	61,1	-2,6	905	786	5,40	V. „	1

4 = Ziemlich ruhig. 5 = Unruhig.

## Generaltabelle

Versuch	Tier	Gewicht des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Temperatur des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Mittlere Temperatur des Tier- behälters	Datum	Sauerstoff- verbrauch	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	RQ.													
Nr.	Nr.	g	°C	°C		g	g	g														
99	2	8234,8 8160,0	38,2 38,2	23,8 24,6 24,9 25,0 25,3 25,4 25,9 25,8	24. III. 1933					15,93 7,96 7,81 8,07 8,71 9,58 9,89 8,74	16,45 7,88 8,15 8,45 8,70 8,50 9,75 8,58	14,75 7,03 6,27 6,86 6,75 7,11 9,49 8,54	0,751 0,720 0,760 0,761 0,726 0,645 0,717 0,714									
					7 <sup>h</sup> —11 <sup>h</sup>																	
					11—13																	
					13—15																	
					15—17																	
					17—19																	
					19—21																	
					21—23																	
					23—1																	
					Zusammen: bestimmt									76,69								
					berechnet									76,51								
					105	2	8473,2 8370,2	38,3 38,5	24,0 24,7 25,1 25,6 25,7 26,1 25,9 25,6					21. IV. 1933					17,23 8,22 8,32 8,87 8,26 9,95 10,30 8,80	18,04 8,45 8,42 9,46 8,42 10,30 10,22 8,88	16,90 6,56 7,08 8,35 6,52 9,29 15,55 12,43	0,761 0,747 0,727 0,776 0,742 0,753 0,722 0,734
														6 <sup>h</sup> 30'—10 <sup>h</sup> 30'								
10 30—12 30																						
12 30—14 30																						
14 30—16 30																						
16 30—18 30																						
18 30—20 30																						
20 30—22 30																						
22 30—24 30																						
Zusammen: bestimmt										79,95												
berechnet										77,44												
89	2	8319,7 8203,3	38,3 38,2	24,2 24,8 25,0 25,2 25,4 25,4 25,5 26,0 26,2						17. II. 1933					18,25 8,56 8,56 10,28 8,11 9,17 9,52 9,63 10,12	18,13 7,89 9,05 10,23 7,90 9,38 9,29 9,43 10,07	16,81 6,76 8,16 8,79 7,01 8,64 9,54 9,14 10,43	0,722 0,670 0,768 0,727 0,708 0,744 0,691 0,712 0,724				
										7 <sup>h</sup> —11 <sup>h</sup>												
					11—13																	
					13—15																	
					15—17																	
					17—19																	
					19—21																	
					21—23																	
					23—1																	
					1—3																	
					Zusammen: bestimmt						92,21											
					berechnet						90,43											
					88	7	11154,4 11083,0	38,3 38,3	25,5 26,0 26,3 26,4 26,1 25,7 25,3 24,7	14. II. 1933									25,87 10,81 10,34 11,89 11,30 10,59 10,56 10,56	23,74 11,02 10,84 11,18 11,68 10,92 10,44 10,13	24,92 9,15 8,79 9,46 10,35 9,01 9,80 9,02	0,667 0,741 0,763 0,684 0,752 0,750 0,719 0,698
7 <sup>h</sup> 30'—11 <sup>h</sup> 30'																						
11 30—13 30																						
13 30—15 30																						
15 30—17 30																						
17 30—19 30																						
19 30—21 30																						
21 30—23 30																						
23 30—1 30																						
Zusammen: bestimmt										101,92												
berechnet										100,87												

\* 1 = Absolute Ruhe. 2 = Vereinzelte Bewegungen. 3 = Wenige Bewegungen.

(Fortsetzung).

Wärmeabgabe pro 24 <sup>h</sup> durch			Korrekt. für die Wärme- produktion	Wärme- produktion pro qm Körperober- fläche und 24 <sup>h</sup>		Cal O <sub>2</sub>	Bemerkung	Verhalten des Tieres*	
Strah- lung	Wasser- ver- dampfung	Ventil		Cal	be- stimmt				be- rechnet
233,9	51,5	27,5	-1,5	684	692	4,66	Vorperiode nach 48 <sup>h</sup> Fasten	2	
224,4	49,1	38,7	-1,5	682	686	4,65	I. Normalperiode	1	
222,3	43,8	43,0	-1,5	676	680	4,69	II. „	1	
226,1	47,9	41,8	-1,4	690	703	4,64	I. Fütterungsperiode, 24,9 g Speck	1	
231,1	47,1	43,7	-1,4	704	751	4,38	II. „	1	
232,0	49,6	49,7	-1,4	725	825	4,10	III. „	1	
265,4	66,2	46,2	-1,4	806	852	4,53	IV. „	2	
227,9	59,6	50,6	-1,4	739	757	4,57	V. „	1	
241,6	59,0	38,8	+2,3	739	737	4,72	Vorperiode nach 72 <sup>h</sup> Fasten	2	
237,2	45,8	38,8	+2,3	699	703	4,67	I. Normalperiode	1	
234,1	49,4	43,8	+2,3	711	713	4,66	II. „	1	
245,1	58,3	44,6	+1,6	754	761	4,69	I. Fütterungsperiode, 23,0 g Speck	1	
233,1	45,5	51,6	+1,6	716	702	4,78	II. „	2	
250,0	64,8	47,6	+1,6	785	776	4,77	III. „	1	
247,2	108,5	51,2	+1,6	880	872	4,72	IV. „ (38,5 g Harn)	2	
241,9	86,7	50,6	+1,6	821	747	5,15	V. „	2	
244,7	58,7	40,0	-3,9	742	782	4,43	Vorperiode nach 48 <sup>h</sup> Fasten	1	
238,7	47,2	35,6	-3,9	694	734	4,33	I. Normalperiode	1	
235,2	56,9	47,6	-3,9	734	743	4,52	II. „	1	
243,6	56,5	46,2	-3,7	742	810	4,33	I. Fütterungsperiode, 20,6 g Speck	2	
243,4	53,5	47,9	-3,7	745	760	4,58	II. „	2	
248,5	60,3	45,3	-3,7	765	790	4,55	III. „	1	
247,1	66,6	58,3	-3,7	805	816	4,61	IV. „	2	
266,0	63,8	47,4	-3,7	816	825	4,62	V. „ (50,8 g Harn)	2	
267,1	72,8	50,3	-3,7	845	868	4,55	VI. „	3	
308,8	86,9	59,3	-1,3	813	910	4,18	Vorperiode nach 48 <sup>h</sup> Fasten	2	
306,9	63,9	51,5	-1,3	753	764	4,63	I. Normalperiode	2	
299,8	61,3	61,9	-1,3	756	735	4,86	II. „	2	
318,9	66,0	50,5	-1,3	778	836	4,35	I. Fütterungsperiode, 20,3 g Speck	2	
311,8	72,2	59,8	-1,3	793	801	4,66	II. „	2	
316,4	62,9	55,9	-1,3	778	754	4,88	III. „	1	
302,8	68,4	66,9	-1,3	783	742	4,70	IV. „ (1,3 g Harn)	1	
301,5	62,9	54,6	-1,3	748	742	4,71	V. „	1	

4 = Ziemlich ruhig. 5 = Unruhig.



## Generaltabell

Versuch	Tier	Gewicht des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Temperatur des Tieres am Beginn und am Ende des Versuchs	Mittlere Temperatur des Tierbehälters	Datum	Sauerstoffverbrauch	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	RQ.																								
Nr.	Nr.	g	°C	°C		g	g	g																									
85	7	11764,7 11659,5	38,4 38,4	25,6 26,1 26,2 26,6 26,9 27,1 26,7 26,3 26,3	27. I. 1933 7 <sup>h</sup> —11 <sup>h</sup> 11—13 13—15 15—17 17—19 19—21 21—23 23—1 1—3	28,66 11,63 12,18 12,91 13,01 12,16 11,09 11,36 11,93	2,86 12,00 11,94 13,34 13,35 12,29 11,70 11,48 12,28	27,82 10,48 10,21 12,20 13,87 11,62 12,92 10,67 12,95	0,732 0,750 0,713 0,751 0,746 0,737 0,767 0,735 0,749																								
										Zusammen: bestimmt	124,93																						
										Zusammen: berechnet	124,88																						
										87	2	8314,5 8210,5	38,1 38,1	24,5 24,9 25,1 25,3 25,5 25,8 25,7 25,8 26,1	3. II. 1933 7 <sup>h</sup> —11 <sup>h</sup> 11—13 13—15 15—17 17—19 19—21 21—23 23—1 1—3	16,92 8,66 7,74 9,13 9,11 10,79 9,13 9,28 9,40	16,76 8,08 7,89 9,17 9,04 9,46 9,57 9,40 8,86	16,80 6,82 6,89 7,76 9,11 7,58 10,18 9,82 11,57	0,721 0,679 0,749 0,730 0,722 0,650 0,762 0,737 0,686														
																				Zusammen: bestimmt	90,16												
																				Zusammen: berechnet	89,18												
																				82	2	8597,4 8476,2	38,2 38,2	24,6 25,1 25,3 25,6 25,9 26,2 26,5 26,9 26,2	17. I. 1933 7 <sup>h</sup> —11 <sup>h</sup> 11—13 13—15 15—17 17—19 19—21 21—23 23—1 1—3	16,17 8,73 9,24 9,40 9,46 9,85 10,55 11,55 8,49	17,86 8,29 8,89 9,55 10,39 9,37 10,63 12,89 9,13	17,42 7,53 8,00 8,64 10,62 8,39 9,96 17,98 13,38	0,803 0,712 0,700 0,739 0,799 0,692 0,733 0,812 0,782				
																														Zusammen: bestimmt	93,44		
																														Zusammen: berechnet	96,50		

\* 1 = Absolute Ruhe. 2 = Vereinzeltte Bewegungen. 3 = Wenige Bewegungen.

(Fortsetzung).

Wärmeabgabe pro 24 <sup>h</sup> durch			Korrekt. für die Wärme- produktion	Wärme- produktion pro qm Körperober- fläche und 24 <sup>h</sup>		Cal O <sub>2</sub>	Bemerkung	Verhalten des Tieres*
Strah- lung	Wasser- ver- dampfung	Ventil		be- stimmt	be- rechnet			
Cal	Cal	Cal						
341,8	97,1	62,7	-1,6	866	976	4,15	Vorperiode nach 24 <sup>h</sup> Fasten	2
345,7	73,1	51,8	-1,6	812	796	4,80	I. Normalperiode	1
316,4	72,2	68,6	-1,6	787	827	4,44	II. „	2
337,0	85,1	49,4	-1,5	814	884	4,34	I. Fütterungsperiode, 19,9 g Speck	2
330,3	96,7	66,9	-1,5	852	889	4,51	II. „	2
330,2	81,0	46,2	-1,5	789	826	4,48	III. „	2
300,2	90,2	69,9	-1,5	798	762	4,93	IV. „	2
309,1	74,4	48,4	-1,5	745	774	4,51	V. „	2
307,2	90,4	58,7	-1,5	787	816	4,54	VI. „	2
244,6	58,6	41,9	-1,7	750	725	4,83	Vorperiode nach 48 <sup>h</sup> Fasten	1
231,1	47,6	37,2	-1,7	686	743	4,32	I. Normalperiode	1
225,5	48,1	46,1	-1,7	695	667	4,89	II. „	1
239,7	54,1	36,2	-1,5	718	785	4,28	I. Fütterungsperiode, 19,8 g Speck	1
237,7	63,6	45,8	-1,5	755	782	4,52	II. „	1
248,7	52,9	35,2	-1,5	732	911	4,74	III. „	1
245,9	71,0	47,2	-1,5	792	792	4,73	IV. „	1
252,9	68,5	47,5	-1,5	803	799	4,72	V. „	1
245,1	80,7	53,2	-1,5	825	807	4,78	VI. „ (38,2 g Harn)	2
243,1	60,8	42,4	-1,8	736	693	5,07	Vorperiode nach 24 <sup>h</sup> Fasten	1
230,0	52,5	52,3	-1,8	700	732	4,54	I. Normalperiode	1
234,8	55,8	51,1	-1,8	727	775	4,38	II. „	1
239,5	60,3	49,5	-1,6	743	792	4,46	I. Fütterungsperiode, 16,9 g Speck	1
247,6	74,1	52,4	-1,6	796	798	4,69	II. „	1
258,5	58,5	56,4	-1,6	795	826	4,50	III. „	2
267,4	69,5	65,3	-1,6	856	887	4,52	IV. „	2
273,7	125,5	64,6	-1,6	988	992	4,77	V. „ (35,6 g Harn)	2
229,1	93,4	58,1	-1,6	792	723	5,32	VI. „	1

4 = Ziemlich ruhig. 5 = Unruhig.

Grunde schon *Benedict* geäußert, daß das Studium der Wirkung reiner Fette auf den Stoffwechsel sehr erwünscht sei.

In unseren Versuchen haben wir die Wirkung verschiedener Mengen von Speckfett auf Wärmeproduktion, Sauerstoffverbrauch, Kohlendioxidproduktion mit der Absicht untersucht, festzustellen, welcher Zusammenhang zwischen der eingeführten Fettmenge und der Stoffwechselsteigerung besteht. Hierbei lenkten wir unser Augenmerk vornehmlich auf die bei unseren Eiweißversuchen beobachtete Erscheinung, daß der Sauerstoffverbrauch und die Wärmeabgabe nicht synchron vor sich gehen müssen.

### Experimenteller Teil.

#### a) Apparatur und Anordnung der Versuche.

Die Versuche wurden in dem von *Hári* (10) angegebenen Respirationskalorimeter ausgeführt und so, wie in der vorhergehenden Mitteilung angegeben wurde, neben der direkten Bestimmung der Wärmeproduktion (direkte Kalorimetrie) letztere auch aus dem direkt bestimmten Sauerstoffverbrauch mit Hilfe des Respirationsquotienten (R.Q.) berechnet (indirekte Kalorimetrie). Der direkt bestimmte, verbrauchte Sauerstoff wurde weiterhin durch Berechnung aus dem Tiergewicht am Beginn und Ende des Versuchs, der Nahrungszufuhr und Kohlensäure-, Wasserdampf-, Harn- und Kotabgabe während des Versuchs ermittelt (indirekter Sauerstoffverbrauch).

Zu den Versuchen dienten drei Hündinnen, von welchen Tier Nr. 2 und 7 bereits in den Versuchen über die spez.-dyn. Wirkung von Eiweiß benutzt worden waren. Das dritte Tier, Hündin Nr. 13, war etwa von derselben Größe wie die beiden anderen, und verhielt sich bei den Versuchen ebenfalls ruhig. Die Versuchstiere hungerten vor dem Versuch 24 bis 72 Stunden, nur im Versuch 107 betrug die Hungerzeit vor dem Versuch 120 Stunden.

Bezüglich der Anordnung und Durchführung der Versuche gilt das in der vorherigen Mitteilung Gesagte. Wie dort wurde nach einer Vorperiode in zwei folgenden Perioden der Grundumsatz und nach erfolgter Verabreichung der in der Fütterungsvorrichtung vorbereiteten Fettmenge hierauf in fünf bis acht zweistündigen Perioden die Wärmeproduktion bestimmt. Die Versuchstiere verzehrten, wie in der Generaltabelle detailliert angegeben ist, von der bereitgestellten Menge Speckfett 17 bis 63 g.

Die Wärmesteigerung wurde in diesen Versuchen ebenfalls in bezug auf den Grundumsatz berechnet und in Prozenten angegeben.

Die Versuchsergebnisse sind in der Generaltabelle zusammengestellt, und zwar nach der Reihenfolge der durchgeführten Perioden (Vorperiode, zwei Normalperioden und eine bis acht Fütterungsperioden).

#### b) Übereinstimmung von direkt bestimmtem und berechnetem Sauerstoffverbrauch.

Wenn man in den Generaltabellen die Summe des in den einzelnen Perioden bestimmten Sauerstoffverbrauchs mit dem berechneten vergleicht, so ergeben sich nur kleine Differenzen, die in der Tabelle I zusammengestellt sind.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Abweichung des berechneten Sauerstoffverbrauchs von dem direkt bestimmten um	Versuch Nr.	Abweichung des berechneten Sauerstoffverbrauchs von dem direkt bestimmten um
66	+ 1,7 %	76	- 0,2 %
63	+ 0,8	98	- 2,4
65	+ 0,8	99	- 0,2
64	+ 1,3	105	- 3,1
107	+ 3,2	89	- 1,9
61	0	88	+ 1,0
74	- 1,1	85	- 0,1
103	+ 2,5	87	- 1,1
95	+ 1,0	82	+ 3,2
97	+ 1,5		

Mittelwert: + 0,3 %.

Wie aus dieser Zusammenstellung zu ersehen ist, schwanken die Abweichungen von - 3,1 bis + 3,4 % und betragen im Mittel + 0,3 %.

c) *Übereinstimmung von direkter und indirekter Kalorimetrie.*

Die aus dem Vorhergehenden sich ergebende vorzügliche Übereinstimmung von direkt bestimmtem und berechnetem Sauerstoffverbrauch, läßt eine sichere Bewertung der in der direkten Kalorimetrie erhaltenen Werte zu. In der Tabelle II sind die Mittelwerte sämtlicher Perioden eines Versuchs (siehe Generaltabelle) getrennt in direkte und indirekte Kalorimetrie auf 24 Stunden und Quadratmeter Körperoberfläche berechnet zu Vergleichszwecken angegeben.

Tabelle II.

Versuch Nr.	Mittlere Wärmeproduktion pro qm Oberfläche und 24 Std.		Abweichung der berechneten Wärmeproduktion von der bestimmten um
	bestimmt Cal	berechnet Cal	
66	847	844	- 0,3 %
63	814	851	+ 4,5
65	912	880	- 3,5
64	841	821	- 2,4
107	919	958	+ 4,2
61	881	917	+ 4,1
74	741	756	+ 2,0
103	825	855	+ 3,2
95	724	745	+ 1,8
97	836	834	- 0,1
76	918	972	+ 5,9
98	868	869	+ 0,1
99	713	743	+ 4,2
105	763	751	- 1,6
89	792	765	- 3,4
88	775	785	+ 1,3
85	804	838	+ 4,2
87	751	779	+ 3,7
82	802	793	- 1,1
		Mittelwert:	+ 1,4 %

Zwischen den beiden Methoden der Ermittlung der Wärmeproduktion ergibt sich demnach ein maximaler Unterschied von + 5,9 bis - 3,4 % im Mittel + 1,4 %).

d) Grundumsatz.

In der Tabelle III wurden die zur Besprechung der Versuchsergebnisse notwendigen Daten getrennt in direkte und indirekte Kalorimetrie zusammengestellt. Aus der Tabelle geht nun in bezug auf den Grundumsatz hervor, daß dieser nicht nur bei den verschiedenen Tieren, sondern auch bei ein und demselben Individuum gewissen Schwankungen ausgesetzt ist, welche letztere im Maximum 10 bis 12 % betragen (siehe vorangehende Abhandlung). Im Mittel zeigt der Grundumsatz bei

Versuchstier	2,	bei direkter Kalorimetrie	714,	bei indirekter	712 Cal,
„	7,	„	„	„	834, „
„	13,	„	„	„	837 „
„	13,	„	„	„	792, „
„	„	„	„	„	815 „

Bei einem Vergleich mit den ebenfalls an den Tieren Nr. 2 und 7 erfolgten Grundumsatzbestimmungen bei den Eiweißversuchen zeigt sich also in den Mittelwerten des Grundumsatzes, wie zu erwarten war, kein Unterschied.

e) Zusammensetzung des verabreichten Fettes.

Von der Zusammensetzung des verabreichten Fettes interessierte uns vornehmlich der ätherlösliche Extrakt, der nach Soxhlet bestimmt wurde, und der N- und Aschengehalt, welcher letzterer allerdings nicht in sämtlichen Versuchen festgestellt worden war. In jedem Versuch aber wurde die Verbrennungswärme des verabreichten Fettes in der Berthelotschen Bombe ermittelt. Der Stuhl des Tieres wurde jeweils nach Beendigung des Versuchs

Tabelle III.

Versuch Nr.	Verzehrt Fettmenge g	100 g des verabreichten frischen Specks enthalten					Im Kote zurück- erhaltene Fettmenge g	Ver- daute Fett- menge g	Kalorien der ver- dauten Fettmenge
		Wasser g	Asche g	N g	Fette g	Chem. Energie Cal			
66	62,9	2,82	0,16	0,09	96,19	923,5	0,386	62,5	577,3
63	59,6	1,12	0,20	0,06	98,48	945,4	0,375	59,2	599,9
65*	48,3	5,10	0,10	0,62	90,91	822,3	0,314	48,0	394,6
64	47,4	0,32	0,07	0,04	99,60	932,4	0,084	47,3	441,2
107	42,7	—	—	—	95,96	912,2	0,212	42,5	387,6
61	41,0	2,68	0,12	0,04	97,04	935,3	0,395	40,6	379,8
74	40,4	1,18	0,30	0,05	96,76	922,0	0,662	39,7	366,4
103	31,5	—	—	—	94,29	893,2	0,754	30,7	274,4
95	31,3	—	—	—	98,62	935,3	0,976	30,3	283,6
97	30,6	—	—	—	99,50	934,3	1,212	29,4	274,6
76	30,7	—	0,07	0,04	96,45	924,2	0,091	30,6	282,9
98	30,2	—	—	—	97,83	927,6	0,537	29,7	275,3
99	24,9	—	—	—	95,98	905,9	0,300	24,6	222,9
105	23,0	—	—	—	95,82	912,0	0,433	22,6	205,9
89	20,6	—	0,10	—	96,72	912,0	0,405	20,2	184,1
88	20,3	0,85	0,04	0,04	99,12	938,9	0,360	19,9	187,2
85	19,9	1,48	0,07	0,08	98,88	936,6	0,575	19,3	181,0
87	19,8	0,72	0,05	0,04	99,15	940,2	0,312	19,5	183,3
82	16,9	—	0,10	0,21	93,07	883,1	0,782	16,1	143,1

\* In diesem Versuche wurde Butter anstatt Speck gegeben.

mit Talk abgegrenzt zur Feststellung der unverdaut gebliebenen Fettmengen, der Ätherextrakt nach *Soxhlet* bestimmt und dann von der verzehrten Fettmenge abgezogen. Mit Hilfe der so erhaltenen verdauten Fettmenge und ihrem Energiegehalt wurde die nutzbare Energie der resorbierten Fettmenge berechnet.

*f) Der Einfluß der Fette auf die Wärmeproduktion.*

Für die Tabelle IV gelten die in der vorangehenden Abhandlung S. 406) wiedergegebenen Ausführungen.

Aus dem Galvanometeraussschlag nach rechts, der sofort nach der Fütterung einsetzte, konnten wir entnehmen, daß die durch Strahlung abgegebene Wärme sich erhöhte. Einen Ausschlag nach links, der eine Verminderung der durch Strahlung abgegebenen Wärme bedeutet hätte, konnten wir nie beobachten. Die Ausschläge nach rechts waren dabei immer größer als jene zur selben Zeit nach Fleischfütterung, trotzdem gewichtsmäßig die verzehrte Fettmenge bedeutend kleiner war, als die von Eiweiß. Desgleichen war auch, wie wir aus dem Verhalten des Hygrometers beurteilen konnten, die Wärmeabgabe durch Wasserverdampfung nach Fettfütterung größer als vorher.

Die Zuverlässigkeit dieser Beobachtungen konnte weiterhin auch durch den Ausgang von Scheinfütterungsversuchen erhärtet werden. Die Scheinfütterungsversuche waren in ebenfalls zweistündlichen Perioden zu dem Zwecke ausgeführt worden, um sicherzustellen, ob die beschriebene Erhöhung der Wärmeabgabe nicht durch den psychischen Zustand (Ungeduld, Warten auf das Aufklappen der Fütterungsvorrichtung, Aufstehen des Tieres) hervorgerufen würde. Wie aber die folgende Zusammenstellung zeigt, können diese Momente mit der obigen Erhöhung der Wärmeabgabe nicht in Zusammenhang gebracht werden, da sich aus den folgenden Ziffern kein Einfluß von Scheinfütterung auf die Wärmeabgabe erkennen läßt.

Die Wärmeproduktion pro 24 Stunden bei Scheinfütterungsversuchen in Cal beträgt bei:

Tier Nr. 2, Versuch 102 in der:			
Normalperiode I . . . . .	299,7	Scheinfütterungsperiode I . . . . .	308,2
„ II . . . . .	304,9	„ II . . . . .	300,6
Im Mittel . . . . .	302,3	Im Mittel . . . . .	304,4
Tier Nr. 7, Versuch 100 in der:			
Normalperiode I . . . . .	449,2	Scheinfütterungsperiode I . . . . .	441,1
„ II . . . . .	434,2	„ II . . . . .	431,8
Im Mittel . . . . .	441,9	Im Mittel . . . . .	436,5
Tier Nr. 13, Versuch 92 in der:			
Normalperiode I . . . . .	392,2	Scheinfütterungsperiode I . . . . .	420,4
„ II . . . . .	426,5	„ II . . . . .	426,8
Im Mittel . . . . .	414,4	Im Mittel . . . . .	423,4

Tabelle IV.

Hand Nr.	Ver-such Nr.	Ge-fütterte Speck-menge g	Direkte Kalorimetrie						Indirekte Kalorimetrie						Mittlerer Wärme-zuwachs aus den angeführten Pe-rioden der direkten und indirekten Kalorimetrie in 0/0																		
			Wärmeproduktion in Cal pro 24 Std. und qm Körperoberfläche						Wärmeproduktion in Cal pro 24 Std. und qm Körperoberfläche																								
			Stunden nach der Fütterung						Stunden nach der Fütterung																								
			2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12													
2	66	62,9	722	811	795	891	898	918	902	759	849	828	859	837	902	924																	
				89	73	169	176	196	180		90	69	100	78	143	165																	
				12,3	10,1	23,4	27,2	21,6	24,9		11,9	9,1	13,5	10,3	18,8	21,7																	
7	63	59,6	773	817	793	839	823	868	—	822	882	840	888	823	854	—								16,9									
				44	20	66	50	95	—		60	18	66	1	32	—																	
				5,7	2,6	8,4	6,5	12,3	—		7,3	2,2	8,0	0,1	3,9	—									5,8								
7	65	48,3	847	922	—	914	934	902	—	820	907	972	870	886	834	—																	
				75	—	67	87	55	—		87	122	50	66	14	—																	
				8,9	—	7,9	10,3	6,5	—		11,4	16,0	6,6	8,6	1,9	—																	
2	64	47,4	774	786	802	850	886	—	—	763	763	768	829	844	—											8,7							
				12	28	76	112	—	—		0	3	66	81	—																		
				1,5	3,6	9,8	14,5	—	—		0	0,4	8,8	10,6	—												6,3						
7	107	42,7	871	912	990	897	920	889	—	906	965	1009	932	974	871	—																	
				41	119	26	49	18	—		59	103	26	68	—35	—																	
				4,7	13,5	3,0	5,7	2,1	—		6,5	11,4	2,9	7,5	—3,8	—												7,3					
7	61	41,0	858	947	889	901	901	836	—	899	974	901	939	858	927	—																	
				89	31	43	43	—22	—		75	2	40	—41	28	—																	
				10,4	3,6	5,0	5,0	—2,5	—		8,4	0,2	4,5	—4,6	3,1	—													3,3				
2	74	40,4	700	781	758	764	723	795	746	718	851	702	788	701	772	790																	
				81	58	64	23	95	46		133	74	20	—17	54	72																	
				11,6	8,3	9,2	3,3	13,6	6,6		18,5	10,3	2,8	—2,3	7,5	10,0																	
13	103	31,5	760	866	868	865	879	860	—	818	942	955	839	898	790	—																	
				106	108	105	119	100	—		124	137	21	80	—28	—																	
				13,9	14,2	13,8	15,7	13,2	—		15,2	16,7	2,6	9,8	—3,4	—																	
2	95	31,3	662	696	709	739	738	—	732	667	716	762	839	750	—	669																	
				34	47	77	76	—	70		49	95	172	83	—	2																	
				5,1	7,1	11,6	11,5	—	10,6		7,4	14,2	25,8	12,4	—	0,3																	
7	97	30,6	773	839	796	813	824	797	—	801	904	838	800	816	772	—																	
				66	23	40	51	24	—		103	37	—1	15	—19	—																	
				8,6	3,0	5,2	6,6	3,1	—		12,9	4,6	—0,1	1,9	—2,4	—																	

Tabelle IV (Fortsetzung).

Hund Nr.	Ver- such Nr.	Ge- fütterte Speck- menge g	Direkte Kalorimetrie										Indirekte Kalorimetrie										Mittleren Wärme- zuwachs aus den angeführten Pe- rioden der direkten und indirekten Kalorimetrie in %
			Wärmeproduktion in Cal pro 24 Std. und qm Körperoberfläche										Wärmeproduktion in Cal pro 24 Std. und qm Körperoberfläche										
			Grund- umsatz	2	4	6	8	10	12	Grund- umsatz	2	4	6	8	10	12	Grund- umsatz	2	4	6	8	10	
7	76	30,7	864	897	929	989	953	952	938	887	147	90	998	955	1012	961	88	125	74	8,4	9,9		
			33	3,8	7,5	8,8	10,3	10,2	8,6	16,6	10,1	12,5	7,7	14,1	8,4	948	901	948	907	786	9,9		
13	98	30,2	825	850	867	908	934	905	—	812	136	89	136	95	—	—	136	89	136	95	—		
			35	4,2	5,1	10,0	13,2	9,7	—	16,7	11,0	16,7	11,7	—	—	—	16,7	11,0	16,7	11,7	—		
2	99	24,9	679	690	704	725	806	739	—	683	703	751	825	852	757	—	703	751	825	852	757		
			11	1,6	3,7	6,8	18,7	8,9	—	20	2,9	9,9	20,8	24,7	10,8	—	20	68	142	169	74		
2	105	23,0	705	754	716	785	—	821	—	708	761	702	776	—	—	—	761	702	776	—	—		
			49	7,0	1,6	11,3	—	116	—	53	—	—	68	—	—	—	53	—	68	—	—		
2	89	20,6	714	742	745	765	805	816	—	738	810	760	790	816	825	—	810	760	790	816	825		
			28	3,9	4,3	7,2	12,9	14,3	—	72	22	22	52	78	87	—	72	22	52	78	87		
7	88	20,3	755	778	793	778	783	748	—	750	836	801	754	742	742	—	836	801	754	742	742		
			23	3,0	5,0	3,0	3,7	—	—	86	61	4	—	—	—	—	86	61	4	—	—		
7	85	19,9	800	814	852	789	798	745	787	811	884	889	826	762	774	816	884	889	826	762	774		
			14	1,7	6,5	—	—	—	—	73	78	15	—	—	—	—	73	78	15	—	—		
2	87	19,8	690	718	755	732	792	803	—	705	785	782	911	792	799	—	785	782	911	792	799		
			18	2,6	9,4	6,1	14,8	16,4	—	80	80	77	206	87	94	—	80	77	206	87	94		
2	82	16,9	714	743	796	795	856	—	792	763	792	798	826	887	—	723	792	798	826	887	—		
			29	4,1	11,5	11,3	19,9	—	78	39	39	45	73	134	—	30	39	45	73	134	—		
			4,1	—	—	—	—	—	10,9	5,2	5,9	9,7	17,8	—	4,0	—	5,2	5,9	9,7	17,8	—		



In bezug auf Dauer und Maximum der Wirkung von Fett können wir aus Tabelle IV zwischen den einzelnen Versuchen keinen geordneten Zusammenhang erblicken. Bei manchen Versuchen (z. B. 107 und 65) zeigt sich das Maximum der Wirkung schon in den ersten beiden Perioden, in anderen Versuchen hingegen (wie 98 und 89) erst in der IV. bzw. V. Periode. Die Dauer der Erhöhung der Wärmeproduktion hält bei einigen Versuchen (z. B. 103 und 76) noch nach 12 Stunden an, während sie bei anderen Versuchen wiederum schon in der III. Periode abgeklungen ist. Des weiteren geht auch aus der Tabelle IV eindeutig hervor, daß zwischen verzehrter Fettmenge und spez.-dyn. Wirkung quantitativ kein Zusammenhang besteht. Diese Verhältnisse werden noch schöner durch die Tabelle V demonstriert, in welcher die verdauten Fettmengen und deren chemische Energie nach abfallenden Werten geordnet und die Mittelwerte aus der Summe der direkten und indirekten Kalorimetrie in Prozenten angeführt sind.

Tabelle V.

Nr. des Versuchs	Gefütterte Fettmenge g	Deren chemischer Energiegehalt Cal	Mittlere spez.-dyn. Wirkung bei		
			Hund Nr. 2	Hund Nr. 7	Hund Nr. 13
66	62,5	577,3	16,9		
63	59,2	559,9		5,8	
64	47,3	441,2	6,3		
65	48,0	394,6		8,7	
107	42,5	387,6		7,3	
61	40,6	379,8		3,3	
74	39,7	366,4	8,3		
95	30,3	283,6	10,6		
76	30,6	282,9		9,9	
98	29,7	275,3			9,5
97	29,4	274,6		4,3	
103	30,7	274,4			11,2
99	24,6	222,9	10,8		
105	22,6	205,9	7,2		
88	19,9	187,2		2,9	
89	20,2	184,1	8,2		
87	19,5	183,3	11,8		
85	19,3	181,0		0,3	
82	16,1	143,1	9,2		

*Es besteht also zwischen verdauter Fettmenge bzw. deren chemischen Energiegehalt und spez.-dyn. Wirkung kein quantitativer Zusammenhang.*

*g) Vergleich zwischen Wärmeproduktion und Sauerstoffverbrauch.*

Bei einem Vergleich der einzelnen Perioden der direkten und indirekten Kalorimetrie kann bei diesen Versuchen ebenso wie bei den früheren Eiweißversuchen festgestellt werden, daß die indirekte Kalorimetrie in 16 von 19 Versuchen in der ersten Periode höhere Werte wie

die direkte Kalorimetrie zeigt. Diese Differenz ist etwas kleiner als jene bei den Eiweißversuchen und beträgt bis 12%. Dieser Unterschied zeigt sich auch in dem kalorischen Wert ( $\text{Cal/O}_2$ ), der im Versuch 74 den Wert 4,29, im Versuch 103 ebenfalls 4,29, im Versuch 98 4,24 und im Versuch 76 4,06 beträgt, wobei diese Werte die tiefsten darstellen, die gefunden worden waren. (So tiefe Werte wie bei den Eiweißversuchen konnten hier nicht beobachtet werden.) Umgekehrt sieht man in den späteren Perioden (IV., V. und VI. Periode) die Werte der indirekten Kalorimetrie kleiner als die der direkten. In diesen Perioden sind daher auch die kalorischen Werte größer, als dem R.Q. entsprechen würde. So beträgt der kalorische Wert im Versuch 66 5,07 (R.Q. = 0,763), im Versuch 103 5,14 (R.Q. = 0,760), im Versuch 95 5,14 (R.Q. = 0,743) und im Versuch 98 5,40 (R.Q. = 0,739).

Die Differenzen zwischen direkter und indirekter Kalorimetrie waren hier bei den ersten bzw. letzten Perioden nicht so bedeutend als bei den Eiweißversuchen, was sich bei den Fettversuchen mit der geringeren spez.-dyn. Wirkung vom Fett gegenüber Eiweiß erklärt. Diese Diskrepanz zwischen direkter und indirekter Kalorimetrie, die nun nicht nur bei den Eiweiß-, sondern jetzt auch bei den Fettversuchen festgestellt werden konnte, darf wohl in derselben Weise wie dort erklärt werden. Es ist nach dieser Erklärung daher auch nicht zu erwarten, daß der Sauerstoffverbrauch mit der Wärmeabgabe synchron verlaufen sollte.

#### *h) Beteiligung der Wasserverdampfung an der Wärmeabgabe.*

Wie aus der Tabelle VI hervorgeht, ist der Anteil der Wärmeabgabe durch Wasserverdampfung bei den Normalversuchen ziemlich konstant und beträgt im Mittel 15 bis 20%. In den ersten Perioden nach der Fettfütterung tritt in manchen Versuchen eine geringe Steigerung der Wasserabgabe (Versuch 61, 97, 98, 85 und 87), bei anderen Versuchen wieder in der II. und III. Periode nach der Fettverabreichung eine kleine Verminderung ein (Versuch 64, 74, 99 usw.). Es scheint daher nach Fettverabreichung die Steigerung der Wärmeabgabe gleichmäßig auf Strahlung und Wasserverdampfung verteilt zu sein, im Gegensatz zur Eiweißfütterung, nach der die Wasserverdampfung einen bedeutend größeren Anteil an der Wärmeabgabe hat als die Strahlung. Diese Erscheinung bei den Eiweißversuchen hatten wir auf den größeren Wassergehalt der verabreichten Nahrung zurückgeführt und diese Erklärung wird durch die Versuche mit Fett erhärtet, da laut Tabelle III der verabreichte Speck nur einen sehr geringen Wassergehalt ergab.

Tabelle VI.

Nr. des Versuchs und Tier	Versuchsperiode	Von der auf 24 Stunden berechneten Wärmeabgabe bei den Fettversuchen entfallen auf			
		Strahlung und Leitung Cal	Wasser- verdampfung Cal	Strahlung und Leitung %	Wasser- verdampfung %
66 2	I. N. P.	280,3	52,3	84	16
	II. "	285,0	60,4	82	18
	I. F. P.	299,6	79,6	79	21
	II. "	306,4	65,5	82	18
	III. "	336,6	79,6	81	19
	IV. "	340,4	79,4	81	19
	V. "	346,7	82,2	81	19
	VI. "	347,8	73,8	82	18
63 7	VII. "	371,7	91,0	80	20
	VIII. "	356,8	86,9	80	20
	I. N. P.	340,6	68,5	83	17
	II. "	334,3	73,6	81	19
	I. F. P.	352,2	77,5	82	18
	II. "	346,1	71,2	83	17
	III. "	356,4	84,7	80	20
	IV. "	350,8	81,9	81	19
65 7	V. "	370,6	81,2	81	19
	I. N. P.	362,3	73,8	83	17
	II. "	375,6	66,8	85	15
	I. F. P.	393,9	86,4	82	18
	II. "	376,4	134,6	74	26*
64 2	III. "	363,8	111,5	77	23
	IV. "	373,6	112,2	77	23
	V. "	376,0	93,3	80	20
	I. N. P.	295,9	63,1	82	18
	II. "	301,8	64,8	82	18
	I. F. P.	306,3	64,2	83	17
107 7	II. "	317,7	59,0	84	16
	III. "	327,4	71,7	82	18
	IV. "	347,0	69,0	83	17
	V. "	363,5	91,8	80	20*
	VI. "	365,6	107,0	77	23
	61 7	I. N. P.	394,7	72,0	85
II. "		455,2	70,4	85	15
I. F. P.		396,5	88,4	82	18
II. "		389,0	137,4	74	26*
III. "		384,1	92,5	81	19
61 7	IV. "	380,6	98,1	80	20
	V. "	391,3	81,0	83	17
	I. N. P.	332,0	116,8	74	26
	II. "	352,1	123,6	74	26
	I. F. P.	349,3	159,3	68	32*
61 7	II. "	349,4	128,0	73	27
	III. "	347,4	136,8	72	28
	IV. "	347,9	135,7	72	28
	V. "	340,5	108,7	76	24

N. P. = Normalperiode. F. P. = Fütterungsperiode.

\* In dieser Periode urinierte das Versuchstier.

Tabelle VI (Fortsetzung).

Nr. des Versuchs und Tier	Versuchsperiode	Von der auf 24 Stunden berechneten Wärmeabgabe bei den Fettversuchen entfallen auf			
		Strahlung und Leitung Cal	Wasser- verdampfung Cal	Strahlung und Leitung o/o	Wasser- verdampfung o/o
74 2	I. N. P.	276,8	48,6	85	15
	II. "	282,2	56,6	83	17
	I. F. P.	299,3	70,7	81	19
	II. "	296,2	63,2	82	18
	III. "	307,7	54,4	88	12
	IV. "	297,1	45,6	87	13
103 13	V. "	309,5	67,1	82	18
	VI. "	300,1	53,0	85	15
	I. N. P.	305,2	69,0	82	18
	II. "	301,2	60,6	83	17
	I. F. P.	340,5	79,2	81	19
	II. "	344,0	76,6	82	18
95 2	III. "	340,6	78,8	81	19
	IV. "	348,0	78,2	82	18
	V. "	320,3	96,6	77	23*
	I. N. P.	261,5	44,3	85	15
	II. "	266,0	41,7	86	14
	I. F. P.	270,4	50,6	84	16
97 7	II. "	275,4	51,2	84	16
	III. "	285,9	54,1	84	16
	IV. "	284,0	55,7	83	17
	V. "	320,5	75,4	81	19*
	VI. "	269,2	67,8	80	20
	76 7	I. N. P.	366,3	58,8	86
II. "		357,8	58,2	86	14
I. F. P.		372,0	84,3	81	19
II. "		370,3	62,8	85	15
III. "		372,8	69,2	84	16
IV. "		373,5	74,7	83	17
98 13	V. "	362,2	71,5	84	16
	I. N. P.	387,6	72,1	84	16
	II. "	386,1	70,5	85	15
	I. F. P.	394,1	82,7	83	17
	II. "	408,1	85,6	83	17
	III. "	412,7	86,2	83	17
76 7	IV. "	417,8	88,5	82	18
	V. "	415,3	90,5	82	18
	VI. "	412,6	86,9	83	17
	I. N. P.	335,2	69,1	83	17
	II. "	348,2	72,8	83	17
	I. F. P.	349,2	80,5	81	19
98 13	II. "	353,1	80,1	81	19
	III. "	349,1	104,5	77	23*
	IV. "	349,8	116,2	75	25
	V. "	344,5	107,4	76	24

N. P. = Normalperiode. F. P. = Fütterungsperiode.

\* In dieser Periode urinierte das Versuchstier.

Tabelle VI (Fortsetzung).

Nr. des Versuchs und Tier	Versuchsperiode	Von der auf 24 Stunden berechneten Wärmeabgabe bei den Fettversuchen entfallen auf			
		Strahlung und Leitung Cal	Wasser- verdampfung Cal	Strahlung und Leitung o/o	Wasser- verdampfung o/o
99 2	I. N. P.	263,1	49,1	84	16
	II. "	265,3	43,8	86	14
	I. F. P.	267,9	47,9	85	15
	II. "	274,8	47,1	85	15
	III. "	281,7	49,6	85	15
	IV. "	311,6	66,2	82	18
	V. "	278,5	59,6	82	18
105 2	I. N. P.	276,0	45,8	86	14
	II. "	277,9	49,4	85	15
	I. F. P.	289,7	58,3	83	17
	II. "	292,7	45,5	86	14
	III. "	297,6	64,8	82	18
	IV. "	298,4	108,5	73	27*
	V. "	292,5	86,7	77	23
89 2	I. N. P.	274,3	47,2	85	15
	II. "	282,8	56,9	83	17
	I. F. P.	289,8	56,5	83	17
	II. "	291,3	53,5	84	16
	III. "	293,8	60,3	83	17
	IV. "	305,4	66,6	82	18
	V. "	313,4	63,8	83	17*
	VI. "	317,4	72,8	81	19
88 7	I. N. P.	358,4	63,9	85	15
	II. "	361,7	61,3	85	15
	I. F. P.	379,4	66,0	85	15
	II. "	371,6	72,2	84	16
	III. "	372,3	62,9	85	15
	IV. "	369,7	68,4	83	17
	V. "	356,1	62,9	85	15
85 7	I. N. P.	397,5	73,1	84	16
	II. "	385,0	71,2	84	16
	I. F. P.	386,4	85,1	82	18
	II. "	397,2	96,7	80	20
	III. "	376,4	81,0	82	18
	IV. "	370,1	90,2	80	20
	V. "	357,5	74,4	83	17
	VI. "	365,9	90,4	80	20
87 2	I. N. P.	268,3	47,6	85	15
	II. "	271,6	48,1	85	15
	I. F. P.	275,9	54,1	83	17
	II. "	283,5	63,6	82	18
	III. "	283,9	52,9	84	16
	IV. "	293,1	71,0	80	20
	V. "	300,4	68,5	81	19
	VI. "	298,3	80,7	79	21*

N. P. = Normalperiode. F. P. = Fütterungsperiode.

\* In dieser Periode urinierte das Versuchstier.

Tabelle VI (Fortsetzung).

Nr. des Versuchs und Tier	Versuchsperiode	Von der auf 24 Stunden berechneten Wärmeabgabe bei den Fettversuchen entfallen auf			
		Strahlung und Leitung Cal	Wasser- verdampfung Cal	Strahlung und Leitung %	Wasser- verdampfung %
82 2	I. N. P.	282,3	52,5	81	19
	II. "	285,9	55,8	84	16
	I. F. P.	288,0	60,3	83	17
	II. "	300,0	74,1	80	20
	III. "	314,9	58,5	84	16
	IV. "	332,7	69,5	83	17
	V. "	383,8	125,5	73	27*
	VI. "	287,2	93,4	75	25

N. P. = Normalperiode. F. P. = Fütterungsperiode.

\* In dieser Periode urinierte das Versuchstier.

#### i) Verhalten des respiratorischen Quotienten.

Die respiratorischen Quotienten (R.Q.) der Normalperioden schwanken, mit Ausnahme vereinzelter Versuche, zwischen 0,72 und 0,74. Diese Werte blieben in den ersten Perioden nach der Fütterung unverändert, nur bei einzelnen Versuchen zeigen sie eine sinkende Tendenz. (Versuch 95 0,695, Versuch 97 0,686, Versuch 98 0,678, Versuch 68 0,684.) Die Werte der zweiten Periode nach der Fütterung waren in der gleichen Höhe wie die der Normalperioden. In der III. und IV. Periode aber zeigen sich oft hohe R.Q. (0,791; 0,798), die *weder* in der Hungerperiode *noch* nach Fettfütterung vorzukommen pflegen, und auf die dann in den folgenden Perioden ein Sinken der R.Q. folgt. Da wir auf Grund der R.Q. unserer zahlreichen Normalperioden und bei unseren Scheinfütterungsversuchen derartige Werte von R.Q. nicht beobachten konnten, dürfen wohl kaum methodische Fehler als Ursache dieser hohen bzw. niedrigen Werte von R.Q. anzunehmen sein. Wir glauben hingegen, diese Werte als Ausdruck einzelner Phasen der intermediären Fettverbrennung ansprechen zu dürfen, die dann bei langdauernden Versuchen kompensativ nicht in Erscheinung treten.

#### Besprechung der Versuchsergebnisse.

Rubner (11) faßte den bei der Fettverbrennung auftretenden Wärmewachstum analog jenem bei den Eiweißstoffen auf, nur in der Wirkung kleiner. Lusk (12) sieht die Ursache der Wärmesteigerung nach Fettfütterung in dem Auftreten intermediärer Fettstoffwechselprodukte, die er als Fettplethora bezeichnet. Keine dieser beiden Anschauungen kann die bisher auf diesem Arbeitsgebiet vorliegenden Versuchsergebnisse zufriedenstellend erklären, wie z. B. den Befund Koraens (13), der überhaupt keine Wärmesteigerung nach Fettzufuhr fand, oder den Gigons (14), der sogar eine Verminderung der Wärmeproduktion nach Fettverabreichung

feststellte. Aber auch bei den anderen Autoren liegen keine einheitlichen Ergebnisse vor, so findet *Lusk* (15) nach Fettverabreichung höhere Werte der spez.-dyn. Wirkung, *Rubner* und *Benedict* (16) wieder tiefere.

In der vorherigen Mitteilung konnten wir auf Grund literarischer Daten die Vermutung aussprechen, daß die spez.-dyn. Wirkung von der Menge der dem betreffenden Organismus zur Verfügung stehenden Reservestoffe in dem Sinne abhängt, daß der Körper nicht auf die sofortige Verbrennung der frisch zugeführten Fettnahrung angewiesen ist, sondern zuerst die für diesen Zweck bereits vorbereiteten Stoffe verwendet. In unseren 19 Versuchen haben wir 17 bis 63 g Fett verabreicht, die 143 bis 577 Cal entsprechen. Würden die Fette sofort verbrannt werden, wie es bei den Eiweißstoffen der Fall ist, dann wäre bei einer größeren Fettgabe eine größere spez.-dyn. Wirkung zu erwarten, bei einer kleineren Fettgabe eine kleinere spez.-dyn. Wirkung. Gerade die Tatsache, daß einerseits oft bei größeren Fettmengen nur ganz kleine Erhöhungen der Wärmeproduktion festzustellen sind (Versuche 61: nach 40,6 g Fett trat eine Wärmesteigerung von 3,3% ein), andererseits wieder in anderen Versuchen bei kleiner Fettgabe höhere Werte der Wärmesteigerung zu beobachten sind (Versuche 84: 19,6 g Fett ergaben eine Wärmesteigerung von 11,8%), zeigt ganz deutlich, daß zwischen verabreichter Fettmenge und spez.-dyn. Wirkung *kein* direkter Zusammenhang festzustellen ist. Wir dürfen daher folgern, daß die eingeführte Fettmenge nicht immer zur *sofortigen* Verbrennung gelangt, sondern der Organismus diese nach Bedarf zu regulieren vermag. Das frisch eingeführte Fett würde nur dann zur sofortigen Verbrennung herangezogen werden, wenn kein großes Reservematerial zur Verfügung steht. Ist ein solches aber vorhanden, dann werden zuerst die schon für die Verbrennung vorbereiteten Reservestoffe verbrannt. Letztere würden dann infolge des vorbereiteten Zustandes, den man sich in Form bereits erfolgter oxydativer Spaltungen vorstellen könnte, eine relativ geringere spez.-dyn. Wirkung zeigen, als frisch eingeführte und sofort zur Verbrennung verwendete Fette, die zur letzteren nicht vorbereitet sind und in diesem Zustande erst oxydativ überführt werden müssen. Eine Erhärtung dieser Hypothese kann in dem Verhalten der spez.-dyn. Wirkung nach Eiweißfütterung erblickt werden, wobei es zu einer sofortigen Verbrennung mit *großer* Wärmetönung kommt

Wir beabsichtigen, zum Beweise unserer Anschauung, das Verhalten der spez.-dyn. Wirkung vergleichend bei stark unterernährten und wohlernährten Tieren zu studieren, um so den Einfluß des vorhandenen oder fehlenden Fettdepots auf die Wärmesteigerung festhalten zu können.

**Zusammenfassung.**

1. Zwischen spez.-dyn. Wirkung und verdauter Fettmenge wurde kein quantitativer Zusammenhang gefunden.

2. Diese Erscheinung wurde mit der Ablagerung des aufgenommenen Fettes in Reservedepots erklärt, so daß es durch die nichterfolgende sofortige Verbrennung auch nicht zu einer entsprechenden spez.-dyn. Wirkung kommen muß.

3. Die Wärmeabgabe verläuft auch nach Fettfütterung, wie bei den Eiweißversuchen gefunden wurde, nicht synchron mit dem Sauerstoffverbrauch.

**Literatur.**

1) Unsere vorangehende Mitteilung. — 2) Pflügers Arch. 78, 459, 1899. — 3) Ebenda 55, 1, 1894. — 4) Gesetze S. 334, 1902. — 5) Skand. Arch. 11, 177, 1901. — 6) Pflügers Arch. 110, 227, 1905. — 7) Ebenda 140, 509, 1911. — 8) J. of biol. Chem. 22, 15, 1915. — 9) Food. Ingest. and Energy Transform. 1918. — 10) Diese Zeitschr. 250, 326, 1932. — 11) l. c. 4. — 12) *Ascher Spiro*, Ergebnisse 33, 103, 1931. — 13) l. c. 5. — 14) l. c. 7. — 15) l. c. 8. — 16) l. c. 4 und 9.